Merrifield-Synthesen natürlicher und variierter Sequenzen der Insulin-B-Kette

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HELMWARD ZOLLNER
aus Klagenfurt

1969

M e r r i f i e l d - Synthesen natürlicher und variierter Sequenzen der Insulin-B-Kette

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

H e l m w a r d Z o l l n e r

aus Klagenfurt

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 3o. Oktober 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schneider

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Literaturübersicht	4
2.1.	Struktur und Wirkung von Insulin	4
2.2.	Synthese	14
2.2.1.	Die M e r r i f i e l d - Synthese	15
2.2.2.	Andere Festkörper-Peptidsynthesen	2o
2.2.3.	Andere Träger für die M e r r i f i e l d - Synthese	21
2.2.4.	Rekombination von A- und B-Kette	21
3.	Eigene Untersuchungen	23
3.1.1.	Der Carboxyl- und Aminogruppenschutz	23
3.1.2.	Permanente Maskierung funktioneller Gruppen in den Seitenketten	26
3.1.3.	Knüpfung der Peptidbindung	27
3.1.4.	Darstellung der Aminosäurederivate	28
3.2.	Synthese von Decapeptiden der C-terminalen Sequenz der Rinderinsulin B-Kette (B_{21} - B_{3o})	31
3.2.1.	Synthese des Decapeptides mit DCCI in DMF	31
3.2.2.	Synthese des Decapeptides mit DCCI/ N-Hydroxysuccinimid in DMF (III, IV)	36
3.2.3.	Synthese des Decapeptides unter Verwendung von t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin-p-Nitrophenyl-ester (V)	37
3.2.4.	Methylenchlorid als Lösungsmittel für die Kupplungsreaktion (VI)	38
3.3.	Sequenzvariierte Decapeptide	4o
3.3.1.	Austausch von Prolin gegen Alanin (VII)	41
3.3.2.	Austausch von Threonin gegen Alanin (VIII)	41

3.3.3. Austausch von Prolin und Threonin gegen Alanin (IX) 42

3.3.4. Austausch von Prolin und Threonin gegen Alanin und Tyrosin gegen Phenylalanin (XI) 44

3.3.5. Austausch von Lysin gegen Alanin 44

3.4. Synthese der Rinder B-Kette 47

3.5. Variierte B-Ketten 51

3.5.1. Austausch von Prolin B 28 und Threonin B 27 gegen Alanin 51

3.5.2. Austausch von Lysin und Histidin 52

3.5.2.1. Austausch von Lysin B 29 gegen Alanin 52

3.5.2.2. Austausch der Histidine B 5 und B 1o gegen Alanin 52

3.5.3. Des-Phe1 Val2 Asn3 Gln4 His5 Ala28 B-Kette 54

3.5.4. Austausch von Tyrosin B 16 gegen Alanin 55

3.6. Darstellung von natürlicher A- und B-Kette und Rekombination zu aktivem Hormon 6o

4. Beschreibung der Versuche 61

4.1. Allgemeines 61

4.1.1. Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe 62

4.2. Präparativer Teil 63

4.2.1. Allgemeine Synthesen 63

4.2.2. Synthese der Decapeptide 8o

4.2.3. Synthese der Rinder B-Kette und deren Analoga 82

4.2.3.1. Kombination von synthetischer B-Kette mit natürlicher A-Kette 84

4.3. Messung der biologischen Aktivität 85

5. Zusammenfassung 87

6. Schrifttum 88

Abkürzungen und Symbole der Aminosäuren, Peptide und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC - IUB Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln.

J. biol. Chem. 241 2491 (1966)

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348 256 (1967)

Bzl-	Benzyl
t-BOC-	t-Butyloxycarbonyl
Cbo-	Carbobenzoxy
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DCHA	Dicyclohexylamin
Dpoc-	2(p-Diphenyl)-isopropyloxycarbonyl
-ONp	p-Nitrophenoxy
NPS-	o-Nitrophenylsulfenyl
Tos-	Tosyl

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn

Professor Dr.Dr. G ü n t h e r W e i t z e l

am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und für die mir während dessen Bearbeitung jederzeit erwiesene großzügige Förderung.

Gleichzeitig bin ich großem Dank Herrn Professor Dr. Friedhelm Schneider verpflichtet für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Der mikroanalytischen Abteilung des Institutes unter Leitung von Frau Akad. Oberrätin Dr. Anna-Maria Fretzdorff danke ich für die analytischen Arbeiten.

Den Herren Dr. K. Rager, Dr. W. Kemmler, Dr. P. Schauder, Dr. R. Renner und Dr. M. Buck danke ich für die Durchführung der Aktivitätsbestimmungen im Fettkörpertest und Frau E. Hofmann für die Aktivitätsbestimmung im Mäusefalltest.

1. Einleitung und Problemstellung

Seit mehr als 4o Jahren werden ausgedehnte Studien durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen Struktur und Hormonaktivität des Insulins aufzuklären.

Allgemein können dabei drei verschiedene Arbeitsrichtungen unterschieden werden:

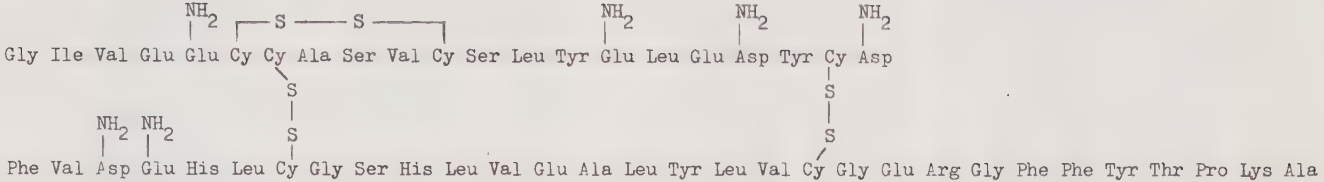
1. Man prüft die Auswirkungen der chemischen Substitution oder Modifikation verschiedener funktioneller Gruppen oder des enzymatischen Abbaues des Insulinmoleküls auf die biologische Wirkung.
2. Man vergleicht die Aminosäuresequenz der Insuline verschiedener Tierspezies miteinander und schließt daraus auf die Notwendigkeit einzelner Aminosäuren für die biologische Wirkung.
3. Neuerdings erlauben die Fortschritte der synthetischen Peptidchemie die Synthese von Insulinen mit abgewandelter Sequenz. Der Vergleich ihrer Aktivitäten gibt Aufschluß über die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Aktivität.

Besonders die von M e r r i f i e l d (s.u.) entwickelte Methode der Peptidsynthese an einem polymeren Träger, welche den Aufbau von Polypeptidketten in relativ kurzer Zeit und mit guten Ausbeuten erlaubt, hat die Versuche zur Synthese von Insulinketten sehr gefördert.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Darstellung von Insulin-B-Ketten berichtet, die sämtlich durch Merrifield-Synthese erhalten wurden.

An Hand der Synthese von Decapeptiden der C-terminalen Sequenz der Insulin - B - Kette (B_{21} - B_{30}) wurde zunächst geprüft, ob die in der Literatur beschriebenen Modifikationen des Kupplungsschrittes in der Merrifield-Synthese auf die Darstellung der B - Ketten übertragbar sind.

Die dargestellten B - Ketten wurden in ihrer Sequenz variiert und nach Kombination mit natürlicher A - Kette in die Hybridinsuline überführt. Der Vergleich der erhaltenen Aktivitäten mit Hybridinsulinen, die B - Kette natürlicher Sequenz enthielten, erlaubt Aussagen über Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung.



Die Struktur des Rinderinsulins (Sanger l.c.[2])

2. Literaturübersicht

2.1. Struktur und Wirkung von Insulin

Schon bald nach der Isolierung des Hormons durch B a n t i n g und B e s t [1] 1922, noch lange bevor S a n g e r [2] 1955 die Strukturaufklärung gelungen war, wurden Versuche angestellt, die wirksamen Gruppen durch chemische Modifikationen des Moleküls herauszufinden. 1926 begann F r e u d e n b e r g [3] seine Untersuchungen am Gesamtinsulin.

Betrachtet man die seitdem erhaltenen Ergebnisse zur Bedeutung der einzelnen funktionellen Gruppen in der Reihenfolge: Disulfidbrücken, freie Carboxylgruppen, aliphatische und aromatische Hydroxylgruppen, freie Aminogruppen, Imidazol- und Guanidin-Reste, so ergibt sich folgendes Bild:

Cystinreste: Schon F r e u d e n b e r g [4] erhielt durch Einwirkung reduzierender Agentien auf das Hormon ein inaktives Produkt. Es besteht heute kein Zweifel mehr, daß die drei Disulfidbindungen für die hypoglykämische Wirkung notwendig sind (Du V i g n e a u d et al. [5], W i n t e r s t e i n e r [6], S t e r n und W i t h e [7]).

Freie Carboxylgruppen: Seit langem ist bekannt, daß Veresterung der Carboxylgruppen zum vollständigen Wirkungsverlust führt (F r a e n k e l - C o n r a t et al. [8,9], F r e u d e n b e r g et al. [4], N i c o l [10], C a r r und C u l h a n e [11]).

Dagegen tritt offenbar kein Wirkungsverlust ein, wenn durch die Desamidierung des Asparagins A 21 ein weiteres freies Carboxyl hinzukommt (C h r a m b a c h und C a r p e n t e r [12]).

Aliphatische Hydroxylgruppen: Die Hydroxylgruppen von Serin und Threonin werden mit konzentrierter Schwefelsäure bei Reaktionstemperaturen um 0°C bevorzugt verestert (F r a e n k e l - C o n r a t et al.[8,9,13]). Ein Teil der phenolischen Hydroxylgruppen nimmt auch an der Reaktion teil. Die Neutralsalze der sauren Sulfatester des Insulins zeigen gleiche Wirkung wie natives Hormon.

Die aliphatischen OH-Gruppen sind also nicht notwendig; auch die Nettoladung (B i s c h o f f [14]) des sauer gewordenen Insulins oder das Verhältnis von basischen zu sauren Gruppen spielen (F o l i n [15]) für die Wirkung keine Rolle.

Aromatische Hydroxylgruppen: F r e u d e n b e r g und Mitarbeiter [16,17] fanden, daß Insulin erst nach dreistündiger Behandlung mit Pyridin/Acetanhydrid seine Wirkung verliert. Durch Einwirkung von Alkalien, wobei die alkalilabileren O-Acetylbindungen gespalten werden, konnten sie etwa 1/3 der ursprünglichen Wirkung zurückerhalten.

Umsetzung mit Keten (S t e r n und W i t h e [18]) liefert zwei von den Reaktionsbedingungen abhängige Produkte. Bei einer Reaktionszeit von nur 5 Minuten werden nur die freien Aminogruppen umgesetzt. Bei längerer Reaktionsdauer findet auch O-Acylierung statt, die zum Wirkungsverlust führt.

Aus Jodierungsexperimenten (F r a e n k e l - C o n r a t et al.[8,13], H a r i n g t o n et al.[19], S p r i n g e l l[20], G a r r o t[21], L e e[22], I z z o et al.[23]) geht hervor, daß zumindest ein Teil der phenolischen OH-Gruppen essentiell ist. G a r r o t [21] beschreibt einen plötzlichen Abfall der Wirkung, wenn mehr als drei Atome Jod pro Molekül Insulin eingeführt werden. Die Tyrosine der A-Kette sollen bevorzugt reagieren.

Nach I z z o und Mitarbeiter [23] ist schon nach Einführung von 1,68 Atomen Jod pro Insulinmolekül die hypoglykämische Wirkung, gemessen im Mäusefalltest, auf ca. 5o % reduziert. Wurde die Aktivitätsbestimmung im Fettkörpertest oder am isolierten Rattendiaphragma durchgeführt, so zeigte sich erst nach Einbau von drei Atomen Jod eine Verminderung der Hormonwirkung auf 5o %.

L e e [22] vertritt die Ansicht, der Tyrosinrest B 26 sei für die Wirkung notwendig.

Durch Sulfatierung mit Pyridin/SO_3 (S l u y t e r m a n und K w e s t r o o [24]) oder Chlorsulphonsäure/Pyridin können bis zu 8,3 Mole SO_3 pro Mol Insulin eingeführt werden, wobei Histidin, Tyrosin, Lysin und die N-terminalen Aminogruppen modifiziert werden. Proportional dem Sulfatierungsgrad sinkt die biologische Aktivität.

Freie Aminogruppen: Modifizierung der freien Aminogruppen des Hormons durch Acetylierung bedingt keinen Wirkungsverlust (F r a e n k e l - C o n r a t[8], J e n s e n et al.[25], F r e u d e n b e r g et al.[16]). Das Hormon behält seine

volle Wirksamkeit, wird es nur kurz mit Formaldehyd behandelt (Fraenkel-Conrat [8]). Unter diesen Bedingungen reagieren die Amino-, Amido- und/oder Guanido-Gruppen. Dehnt man die Reaktionszeit auf drei Tage aus, so tritt fast vollständige Desaktivierung ein. Nicht die Reaktion der einzelnen Gruppen mit Formaldehyd führt zum Wirkungsverlust, sondern Quervernetzung zwischen den Aminogruppen einerseits und den Amid-, Guanido- und phenolischen Hydroxylgruppen auf der anderen Seite; denn wird Acetylinsulin der Formaldehydbehandlung ausgesetzt, bleibt die Wirkung erhalten.

Totalen Wirkungsverlust bedingt Umsetzung mit Phenylisothiocyanat (Hopkins und Wormall [26], Jensen und Evans [27]) und m-Chlorphenylisothiocyanat (Fraenkel-Conrat [8]). Jedoch wurde die Spezifität dieser Reagentien oftmals in Frage gestellt (Olcott und Fraenkel-Conrat [28], Miller und Stanley [29]).

Tietze, Mortimore und Lomase [30] stellten durch Umsetzung des Hormons mit Fluoresceinisothiocyanat Fluoresceinderivate von Insulin dar. Bevorzugt werden die N-terminalen Aminogruppen der beiden Ketten angegriffen. Die biologische Aktivität war auf 60 - 80 % des natürlichen Hormons gesunken, sobald 1,2 - 1,8 Mole Reagens eingeführt worden waren.

Bromer, Sheehan, Berris und Arquilla [31] konnten zeigen, daß die Aminogruppe des Phenylalanins B 1 viel schneller umgesetzt wird als die des Glycins A 1 und die ε-Aminogruppe des Lysins nur sehr langsam mit Fluoresceiniso-

thiocyanat reagiert. Unter Ausnutzung dieses Befundes konnten die genannten Autoren nach chromatographischer Reinigung über DEAE-Sephadex reine mono-, di-, und trisubstituierte Derivate bekommen. Das Monoderivat, bei dem nur die Aminogruppe in B 1 substituiert ist, zeigte noch 40 %, das Disubstitutionsprodukt, in dem die Aminogruppen von B 1 und A 1 umgesetzt waren, nur noch 4 % der ursprünglichen Hormonaktivität. Waren alle drei freien Aminogruppen substituiert, wurde keine Wirkung mehr beobachtet.

Auch führt Behandlung mit 2,4,6 Trinitrotoluol (M i l l s [32]) zum vollständigen Wirkungsverlust.

Wurden die drei freien Aminogruppen des Hormons mit dem t-Butyloxycarbonylrest blockiert, so zeigt es nur noch 13 % der ursprünglichen blutzuckersenkenden Wirkung (L e v y und C a r p e n t e r [33]). Mit Trifluoressigsäure kann das tri-t-Butyloxycarbonylinsulin zu vollaktivem kristallisierbaren Hormon regeneriert werden.

Umsetzung mit p-Nitrophenylestern der t-BOC-geschützten Aminosäuren Alanin, Lysin, Methionin und Glutaminsäure führt zu tri-Alanin-, tri-Lysin-, tri-Methionin- und tri-Glutaminsäure-Insulinen (L e v y und C a r p e n t e r [33]). Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppen zeigten diese Insulinderivate noch 50 % Aktivität. Die Aktivitätsminderung könnte der Substitution des Lysinrestes zugeschrieben werden, da bei einigen Tierspezies Insuline mit längeren Ketten, aber normaler Wirkung vorkommen.

Guanidierung von Insulin mit O-Methyl-isoharnstoff (E v a n s und S a r o f f [34]) führt zu vollständiger Umwandlung von Lysin zu Homoarginin. Die N-terminale Aminogruppe des Phenylalanins B 1 wird nur zu 10 % umgesetzt. Da dieses Insulinderivat volle biologische Wirkung zeigt, kann angenommen werden, daß Lysin B 29 nicht essentiell ist.
Auch reagiert 2,4 Dinitrobenzolsulfonat in 0,1 M Natriumbicarbonatlösung nur mit der ε-Aminogruppe von Lysin zu wirksamen N^{ε}-Dinitrophenylinsulin (L i [35]).

Imidazolreste: Diazotierte Sulfanilsäure reagiert nicht spezifisch mit dem Imidazolrest des Histidins, sondern in jeder Stufe der Reaktion sind die phenolischen Hydroxylgruppen beteiligt (F r a e n k e l - C o n r a t [8]). Bis zu einem gewissen Grad können Imidazol- und die Tyrosinreste ohne Wirkungsverlust modifiziert werden. Darüber hinaus führt die Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure zur Inaktivierung. Die Photooxydation von Insulin mit Sauerstoff in Gegenwart von Methylenblau als Sensibilisator führt zur Zerstörung des Imidazolringes von Histidin. Tyrosin und Cystin werden kaum angegriffen.
W e i t z e l [36] und W e i l [37] benutzten diese Methode unabhängig voneinander, um die Frage zu prüfen, ob Imidazolgruppen für die biologische Aktivität des Insulins notwendig sind. Beide Autoren fanden übereinstimmend mit fortschreitender Imidazolzerstörung einen linearen Abfall der Hormonwirkung. Die Tyrosinverluste waren gering. Nach Zerstörung

von 3o % des vorhandenen Histidins sind immer noch 86 % Tyrosin vorhanden; die biologische Wirkung aber ist auf 3o % gesunken. Bei 95 %iger Zerstörung des Histidinanteils sind erst 3o % Tyrosin zerstört, die Wirkung aber ist fast vollständig verschwunden. Die Frage, ob beide oder nur jeweils ein Histidinrest notwendig sind, läßt sich daraus nicht beantworten.

Mit Acrylnitril reagieren bei pH 8,6 nur Aminogruppen und die Imidazolreste des Insulins. Die Wirksamkeit des erhaltenen Cyanoäthylinsulins beträgt nur mehr 3o-4o % der des nativen Hormons (H u m b e l und Mitarbeiter [38]). Dabei zeigte sich [38], daß der Histidinrest B 5 um einen Faktor 2-3 schneller mit Acrylnitril reagiert als Histidin B 1o. Da vorzugsweise Histidin B 5 umgesetzt wird, die Wirkung schon nach kurzer Reaktionszeit abfällt und bei weiterer Umsetzung keine weitere Desaktivierung eintritt, schließt H u m b e l [38] daraus, daß Histidin B 5 essentiell sein könnte.

Guanidogruppe: Bei der schon oben erwähnten Behandlung des Hormons mit Formaldehyd (bei pH 11,5) wird kein Aktivitätsverlust beobachtet. Da bei höheren pH Werten neben den Aminogruppen auch die Amido- und Guanido-Gruppen reagieren, schließt F r a e n k e l - C o n r a t [8] daraus, daß der Argininrest B 22 nicht essentiell ist.

Du V i g n e a u d ' s Arbeiten zeigen besonders deutlich, wie problematisch es ist, aus Substitutionseffekten auf den Wert einer Gruppe zu schließen. So hat Oxytocin eine biologische Wirksamkeit von 485 I.E./mg. Acetyloxytocin zeigt nur noch eine Aktivität von 1,7 I.E./mg, synthetisches Desaminooxytocin hat aber mit 750 I.E./mg eine wesentlich höhere biologische Aktivität als Oxytocin.

Auswirkungen des enzymatischen Abbaues auf die biologische Aktivität: Hydrolysierenden Enzymen gegenüber ist das native Hormon recht beständig. Vorsichtiger Abbau mit Carboxypeptidase führt zu vollaktivem Desalanin-Insulin (H a r r i s und L i [39], S l o b i n und C a r p e n t e r [40], N i c o l [41]). Weiterer Abbau führt zuerst zum Verlust der Amidogruppe des C-terminalen Asparagins der A-Kette und dann zur Entfernung des Asparaginrestes A 21. Desalanin-desamido-Insulin zeigt noch etwa 2/3 der Wirkung (S l o b i n und C a r p e n t e r [42]), Desalanin-desasparagin-Insulin (S l o b i n und C a r p e n t e r [40], N i c o l [41]) keine Wirkung mehr.

Abbau mit Trypsin führt im ersten Schritt zu Desalanin-Insulin und schließlich zu einem unwirksamen Desoctapeptid-Insulin (N i c o l [41], C a r p e n t e r et al. [43,44]). Ein für die Insulinwirkung wichtiges Zentrum scheint somit in dem Teilstück B 23 - B 30 zu liegen.

Abbau mit Leucinaminopeptidase führten S m i t h et al. [45] zur Annahme, daß das N-terminale Hexapeptid der B-Kette für die biologische Wirkung nicht notwendig sei. Wegen der Versuchsanordnung wurde dieses Ergebnis jedoch angezweifelt (P r o u t [46]).

Eingangs wurde erwähnt, daß neben der seit Jahrzehnten durchgeführten Technik der Substitution und Modifikation von Aminosäureresten am Insulin in jüngster Zeit die synthetische Darstellung des Hormons mit abgewandelter Sequenz möglich geworden ist. Folgende Ergebnisse wurden mit derartigen Insulinvarianten erhalten:

Cystinreste: J o s t et al.[47] synthetisierten ein Insulin, bei dem ein Schwefel des intrachenaren Disulfidringes durch eine Methylengruppe ersetzt war. Für das ungereinigte Produkt wurden Insulinaktivitäten von o,19 bis o,34 I.E./mg gefunden. W e i t z e l und Mitarbeiter [48] stellten eine A-Kette dar, der der intrachenare Ring fehlte. Das nach Kombination mit natürlicher B-Kette erhaltene Hybridinsulin zeigte eine geringe Restaktivität.

Carboxylgruppen: Fortfall aller Säureamidgruppen der A-Kette und die damit verbundene Vermehrung der sauren Gruppen im Molekül bedingen keine Verminderung der Aktivität (H ö r n l e, W e b e r und W e i t z e l [49]).

Aliphatische Hydroxylgruppen: Eine Bestätigung der Befunde von F r a e n k e l - C o n r a t et al. [8,9,13], wonach die aliphatischen Hydroxyle zur Hormonwirkung nicht notwendig sind, konnten W e i t z e l und Mitarbeiter [5o,51] durch die Synthese erbringen. Die Serinreste A 12 und B 9 können ohne Wirkungsverlust durch Alanin ersetzt werden.

Aromatische Hydroxylgruppen: Beide Tyrosine der A-Kette können ausgetauscht werden. A 14 kann durch Alanin ersetzt werden, während Tyrosin A 19 nur gegen Phenylalanin ohne Aktivitätsverlust ausgetauscht werden kann. Die beiden aromatischen Hydroxyle sind also für die Insulinwirkung nicht notwendig, jedoch muß in Position A 19 ein aromatischer Rest vorhanden sein (H ö r n l e , W e b e r und W e i t z e l [49]).

Darüber hinaus haben die synthetischen Insulinvarianten Aufschluß über die Bedeutung von Aminosäureresten erbracht, welche mit der Technik der Substitution und Modifikation nicht zu erfassen sind (wie z.B. die Isoleucin-, Valin-, Leucin- und Glycin-Reste) und über den Einfluß der Kettenverkürzung auf die biologische Aktivität.
So ergab sich, daß die ersten drei Aminosäuren der A-Kette (Gly, Ile, Val) hoch essentiell sind (W e i t z e l et al. [49,52], B r a n d e n b u r g und O o m s [53]), während die ersten drei Aminosäuren der B-Kette (Phe, Val, Asn) ohne Beeinträchtigung der Wirkung weggelassen werden können (W e b e r und W e i t z e l [51]).

2.2. Synthese

D i x o n und W a r d l a w [54] und D u et al.[55] gelang es erstmals 1960, aus getrennter A- und B-Kette des Insulins wieder aktives Hormon zu erhalten. Waren die Ausbeuten auch nur gering (1 - 2 %) so war damit dennoch der Weg für die Synthese des Hormons aus den beiden Ketten vorgezeichnet. K a t s o y a n n i s [56] berichtete 1963 über die Synthese eines halbsynthetischen Insulins aus synthetischer A-Kette und natürlicher B-Kette. Wenig später veröffentlichten Z a h n und Mitarbeiter[57] die Synthese von vollsynthetischem Schafinsulin; 1965 publizierte eine chinesische Arbeitsgruppe (K u n g et al.[58]) die Reindarstellung und Kristallisation von künstlichem Rinderinsulin.

Drei Hauptprobleme sind es, die die Synthese von Insulin aufwirft (Z a h n [59]):

1. Die Synthese der beiden geschützten Ketten
2. Die Entfernung der Schutzgruppen ohne Schädigung des Moleküls
3. Die Kombination der beiden Ketten zu aktivem Hormon

Das erste Problem wurde von K a t s o y a n n i s [56], Z a h n [57] und K u n g et al. [58] in Anlehnung an die Arbeiten von Du V i g n e a u d gemeistert.
Die Synthesen der verschiedenen Arbeitsgruppen unterscheiden sich nur in methodischen Details. Alle drei Arbeitsgruppen ver-

wandten die Methode der Fragmentkondensation. Die Peptid-untereinheiten erhielten sie durch stufenweise Kupplung. Nach dieser klassischen Methode wurden von K a t s o y a n n i s et al.[60] noch halbsynthetisches Schaf-, Rinder- und Schweine-Insulin und vollsynthetisches Schaf- und Human-Insulin dargestellt.

Z a h n und Mitarbeiter [57] geben für die geschützte A-Kette eine Ausbeute von 2,9 % und für die geschützte B-Kette von 7 % an. Die Ausbeuten an geschützten Ketten können mit der von M e r r i f i e l d [61] eingeführten Peptidsynthese an einem polymeren Träger wesentlich verbessert werden. Nicht nur die Erhöhung der Ausbeuten, sondern auch die Verkürzung der Arbeitszeit sind Vorteile dieser Methode.

M a r g l i n und M e r r i f i e l d [62] konnten mit dieser Technik in wenigen Wochen geschützte A- und B-Ketten mit einer Ausbeute von 69 % bzw. 64 % darstellen.

2.2.1. Die Merrifield - Synthese [61-65]

Der geniale Gedanke M e r r i f i e l d 's war es, die Synthese einer Peptidkette an einem Träger, also in fester Phase durchzuführen. Ein N-Acylderivat der C-terminalen Aminosäure des darzustellenden Peptides wird in Gegenwart von Triäthylamin an ein chlormethyliertes Copolymerisat aus Styrol/1-2 % Divinylbenzol benzylesterartig gebunden.

Als α-Aminoschutzgruppe hat sich die von C a r p i n o [66] eingeführte t-Butyloxycarbonylgruppe als besonders geeignet erwiesen. Daneben werden noch andere acidolytisch abspaltbare

Reste wie der Benzyloxycarbonyl - (M e r r i f i e l d [61]), der o-Nitrophenylsulfenyl - (N a j j a r und M e r r i - f i e l d [67], K l o s t e r m e y e r et al. [68]) und der 2(p-Diphenyl)-isopropyl-oxycarbonyl-Rest (S i e b e r und Iselin[69]) verwendet.

Im zweiten Schritt wird die N α-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (N a j j a r [67]), HCl in Eisessig oder Dioxan (M e r r i f i e l d [64]) oder 98 %iger Ameisensäure (H a l p e r n [7o]) abgespalten und die Aminogruppe mit Triäthylamin freigesetzt.

Die freie Aminogruppe wird nun mit der nächsten N-geschützten Aminosäure nach der Carbodiimid-Methode (S h e e h a n [71]) umgesetzt. Daneben wird noch Woodward - Reagens-K (W o o d - w a r d et al. [72]) verwendet; es haben auch aktivierte Ester von N-Acylaminosäuren zur Verlängerung der Peptidkette Verwendung gefunden (K l o s t e r m e y e r et al. [68], B o d a n s k y [73], B e y e r m a n et al. [74], H ö r n l e [75]). Um quantitativen Umsatz zu bekommen, wird die Carboxylkomponente in 3-5 fachem Überschuß zugesetzt.

Wiederholung des zweiten und dritten Schrittes führt zur Verlängerung des Peptides um jeweils eine Aminosäure.

Nach vollendeter Synthese wird das Peptid mit HBr/Trifluoressigsäure (M e r r i f i e l d [64]), Hydrazin (K e s s l e r und I s e l i n [76], O h n o und A n f i n s e n [77]), flüssigem HF (L e o n a r d und R o b i n s o n [78], S a k a k i b a r a et al. [79]) durch Umesterung H a l p e r n et al. [8o]) oder durch alkalische Verseifung (L o f f e t [81])

vom Träger abgelöst. Will man das Azid der carboxylendständigen Aminosäure erhalten, so wird mit flüssigem Ammoniak oder ammonalkalischem Methanol vom Harz abgespalten (Bodanzsky und Sheehan [73], Beyerman et al.[74]).

Eine Blockierung aller Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren erscheint wegen des großen Überschusses an Carboxylkomponente erforderlich. Die Schutzgruppen sind die gleichen wie in der klassischen Synthese.

Die Hydroxylgruppen von Serin und Tyrosin werden als O-Benzyläther geschützt, Cystein und Histidin werden als S-Benzyl- bzw. N^{im}-Benzyl-Derivate eingesetzt. Der Guanidorest von Arginin wird mit dem Nitro- oder Tosylrest und die -Aminogruppe von Lysin wird mit dem Carbobenzoxy- oder Tosylrest blockiert. Sekundäre Carboxylfunktionen werden als Benzylester geschützt. Die Synthese von O-Benzyl-threonin wurde beschrieben (Mizoguchi et al. [82]), jedoch wird Threonin meist mit freier Hydroxylgruppe eingesetzt (Marglin und Merrifield [62]). Ebenfalls kann Tyrosin ohne OH-Schutz eingesetzt werden (Beyerman et al.[74]). Synthesen mit ungeschützter N^{im}-Funktion von Histidin und Arginin in der protonierten Form wurden von Loffet [81] publiziert.

Zur Bestimmung der Umsatzrate des Peptidkupplungsschrittes verwenden Weygand und Obermeier [83] den Edmann - Abbau in Kombination mit massenspektrographischer

Verdünnungsanalyse. Mit dieser Technik konnten sie zeigen, daß nicht alle Aminosäuren gleich gut reagieren und eine Verlängerung der Reaktionszeit zwar eine Steigerung des Umsatzes bringt, jedoch quantitativer Umsatz schneller erzielt wird, wenn man dieselbe Aminosäure mehrmals mit dem an den Träger gebundenem Peptid reagieren läßt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Brauchbarkeit der Merrifield-Methode zur erfolgreichen Synthese biologisch wirksamer Polypeptide ist, daß alle Kondensationsschritte racemisierungsfrei verlaufen. Gaschromatographische Prüfung (W e y g a n d und R a g n a r s o n [84]) und enzymatischer Abbau (R i c h a r d s et al. [85]) zeigten einen sterisch einheitlichen Verlauf aller Reaktionsschritte.

Wie leistungsfähig die Merrifield-Synthese ist, wurde durch die Darstellung verschiedener biologisch aktiver Polypeptide bewiesen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Peptide die nach der Festkörpermethode von Merrifield dargestellt wurden.

Peptide	Literatur
Bradykinin	(64,67,78)
Methionyl-lysyl-bradykinin	(65)
Bradykinyl-bradykinin	(67)
All-D-Bradykinin	(85 a)
Ile^5-Angiotensin II	(86)
Asp^1-Ile^5-Angiotensin II	(87)
Ala^3-Ile^5-Angiotensin II	(87)
Ile^5-Ala^8-Angiotensin II	(88)
Gly^5-Gly^{10}-Gramicidin S	(68,89)
Gramicidin S	(90)
Insulin Rinder A - Kette	(64,75)
Insulin Schaf A - Kette	
Insulin Human A - Kette	(59)
Insulin Rinder B - Kette	(51,62,91)
Insulin Human B - Kette	(59)
Oxytocin	(74,92-96)
Desamino-oxytocin	(97)
Ser^4-Gln^8-Oxytocin	(98)
Ferredoxin	(99)
Ribonuclease A	(100)
TMV-Hüllprotein 108 - 112	(101)
Ile^1-Pro^3-Ala^5-Angiotensin II	(102)
Lysin-Vasopressin	(103)
Oxytocinsäure	(95)
Ile^1-Angiotensin II	(102)
Ala^5-Angiotensin II	(102)
Physelaeminfragmente	(96)

2.2.2. Andere Festkörper-Peptidsynthesen

L e t s i n g e r [1o5] führt im Gegensatz zu M e r r i f i e l d die Peptidsynthese vom Amino-Ende her durch. Die erste Aminosäure, in diesem Fall die N-terminale des zu synthetisierenden Peptides wird in einer benzyloxycarbonylähnlichen Bindung an ein Popcornpolymer fixiert. Dabei erfolgt die Kettenverlängerung mit der Methode der gemischten Anhydride. Aminoacylpolystyrol, einen in organischen Lösungsmitteln löslichen Träger, benutzten S h e m y a k i n und Mitarbeiter [1o6] zur Synthese von Gly^5-Gly^{1o}-Gramicidin S.

F r i d k i n et al. [1o7,1o8] setzen eine N-acylierte Aminosäure mit einem polymeren Alkohol (Poly-4-hydroxy-3-nitrostyrol-4 %-divinylbenzol) zu einem aktiven Aminosäureester um. Aminolyse der am Polymeren fixierten aktiven Esterbindung mit einem Aminosäure- oder Peptidester führt zur Kettenverlängerung. Nicht umgesetzter Ester und polymeres Phenol wird abfiltriert, in Lösung verbleibt ein N-geschützter Peptidester, der nach Deblockierung der Aminogruppe mit dem nächsten aktiven polymeren Ester umgesetzt werden kann.

Polymeraktivierte Aminosäurederivate erhalten W i e l a n d und B i r r [1o9] aus einem Polykondensationsprodukt von 4,4' Dihydroxy-diphenyl-sulfon mit Formaldehyd, die Hydroxylkomponente und den entsprechenden Mixed Anhydrid der Aminosäure.

Die Darstellung cyclischer Peptide ist eine erfolgversprechende Anwendungsmöglichkeit dieser Methodik. Nach selektiver Entfernung der Aminoschutzgruppe cyclisiert die über eine aktivierte Esterbindung mit dem polymeren Träger verbundene Peptidkette durch intramolekulare Aminolyse (F r i d k i n et al. [110]).

2.2.3. Andere Träger für die M e r r i f i e l d - Synthese

L o s s e und Mitarbeiter [111] verwenden ein Phenol-Formaldehydharz vom Resitoltyp zur Festkörper-Peptidsynthese. Ein Phenolharz wurde von I n u k a i et al. [96] durch Reaktion von Phenol mit S-Trioxan erhalten. An diesem Träger wurden Oxytocin und einige Physalaeminfragmente synthetisiert. T e s s e r und E l l e n b r o e k [112] und S c h r e i b e r [113] führen durch geeignete Reaktionen Hydroxylgruppen in das chlormethylierte M e r r i f i e l d - Polymer ein. Die erste Aminosäure kann dann mit dem so modifizierten Harz unter milden Bedingungen verestert werden.

2.2.4. Rekombination von A- und B-Kette

Das Problem der Kettenverknüpfung ist von verschiedenen Arbeitsgruppen behandelt und mehr oder weniger erfolgreich gelöst worden.
D i x o n und W a r d l a w [54] und D u et al. [55] waren die ersten, die aktives Insulin aus den getrennten Ketten

erhielten. In den letzten Jahren wurden wesentliche Fortschritte bei der Rekombination erzielt. D u und Mitarbeiter [114] erreichten Ausbeuten bis zu 5o %, K a t s o y a n n i s et al. [115,116] sogar 6o - 8o %. Diese hohen Rekombinationsausbeuten konnten jedoch bis jetzt in anderen Laboratorien nicht reproduziert werden. P r u i t t [117] kommt mit der Technik von D u auf nur 5 % und H ö r n l e [118] erreicht mit der Methode von K a t s o y a n n i s 2o - 25 %. Z a h n und Mitarbeiter [119] oxydierten A-Kette, bis 5o % der Sulfhydrylgruppen in das Disulfid überführt waren, und vervollständigten die Oxydation dann nach Zugabe von B-SH-Kette. Die erhaltenen Insulinaktivitäten lagen um 25 %. Von derselben Arbeitsgruppe wurde die Isolierung einer A-Kette mit intaktem intrachenarem Ring beschrieben (Z a h n und D r e c h s e l [12o]); obwohl sich die Zahl der möglichen Reaktionsprodukte auf zwei verringert - bei Reaktion von B-Kette mit vollreduzierter A-Kette sind 12 Kombinationsprodukte möglich - lag die Insulinausbeute bei nur 2o %.

3. Eigene Untersuchungen

3.1.1. Der Carboxyl- und Aminogruppenschutz

Da jede der zu verknüpfenden Aminosäuren jeweils beide an der Peptidbindung beteiligten Gruppen im Molekül enthält und teils noch reaktionsfähige Gruppen in der Seitenkette vorkommen, müssen alle nicht an der Peptidbindung beteiligten funktionellen Gruppen geschützt werden.

Der Schutz der Carboxylfunktion der C-terminalen Aminosäure des darzustellenden Peptides wirft bei der M e r r i f i e l d - Synthese keine Probleme auf, da diese mit dem polymeren Träger verestert ist.

Zum Schutz der α-Aminogruppe sind eine große Zahl von Verbindungen bekannt, doch sind nicht alle für die Festkörperpeptidsynthese geeignet. An Schutzgruppen für die nicht an der Peptidbindung beteiligte α-Aminogruppe werden folgende Anforderungen gestellt:

1. Die Gruppe muß leicht abspaltbar sein.
2. Die geschützten Aminosäureseitenkettenfunktionen dürfen unter den Abspaltbedingungen der α-Aminoschutzgruppe nicht deblockiert werden.
3. Die Reaktionsprodukte der Deblockierungsreaktion müssen leicht entfernbar sein.

Anfangs verwendete M e r r i f i e l d [61] den Carbobenzoxyrest als α-Aminoschutz. Dieser kann mit HBr in Eisessig abgespalten werden, wobei auch ein geringer Teil der Peptid -

Harz Bindung gelöst wird. Bei der Synthese längerer Peptide wird dadurch die Ausbeute beeinträchtigt. Auch viele der gängigen Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen werden von HBr/Eisessig gespalten.

Der t-Amyloxycarbonylrest (S a k a k i b a r a et al. [121]) muß mit 1o %iger methanolischer HCl 2 Stunden lang umgesetzt werden, um von der α-Aminogruppe quantitativ entfernt zu werden. Bei der Synthese eines Peptides von 3o Aminosäuren wäre die erste Aminosäure 6o Stunden dieser Behandlung ausgesetzt, die folgenden entsprechend kürzer. Bei so langer Einwirkungsdauer dieser hohen Säurekonzentration sind unerwünschte Deblockierungen von maskierten Seitenkettenfunktionen zu befürchten.

Der t-Butyloxycarbonylrest (t-BOC) als Aminoschutz bei der M e r r i f i e l d - Synthese ist die Gruppe der Wahl. Die t-BOC-Aminosäurederivate lassen sich in guten Ausbeuten und sehr rein erhalten, zudem sind es vorwiegend kristalline Verbindungen. Die Entfernung des t-BOC-Restes von Peptidderivaten gelingt leicht mit 1 N HCl in Eisessig oder Dioxan, Trifluoressigsäure in Methylenchlorid und Ameisensäure. Nebenprodukte dieser Reaktion sind die Gase Isobuten und CO_2. Ein Nachteil dieser Schutzgruppe ist, daß säurelabile Gruppen wie der t-Butyl- und Tritylrest als Seitenkettenschutz in Verbindung mit dem t-BOC-Rest als Aminoschutz nicht verwendet werden können.

Nα-Aminoschutzgruppen, die auch die Verwendung dieser und anderer säurelabiler Reste zur Blockierung der dritten funktionellen Gruppe im Molekül erlauben, sind der o-Nitrophenyl-

sulfenylrest (NPS) (Z e r v a s et al. [122]) und die von S i e b e r und I s e l i n [69] beschriebene 2(p-Diphenyl)-isopropyloxycarbonyl-Gruppe (Dpoc).

Der NPS-Rest ist selektiv neben den genannten Gruppen mit o,oo5 · o,ol N HCl, HCN, H_2SO_3 und Thioacetamid abspaltbar. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte sind jedoch schwer vom Träger auszuwaschen. Ein weiterer Nachteil dieser Aminoschutzgruppe ist, daß NPS-Derivate aktivierter Ester sterisch gehinderter Aminosäuren nur unvollständig bei der Aminolyse mit einem am Träger fixierten Peptid reagieren.

Der Dpoc - Rest zeigt diese Nachteile nicht, doch ist die Darstellung der Dpoc - Aminosäurederivate noch umständlich. Die Ausbeuten sind nicht besonders hoch.

Da bei der Festkörpersynthese der Rinderinsulin-B-Kette die Verwendung acidolytisch leicht spaltbarer Seitenkettenschutzgruppen keinen Vorteil bringt (Histidin muß als N^{im}-Benzyl-, Arginin als N^{G}-Tosylderivat eingesetzt werden, deren Deblokkierung nur mit Natrium in flüssigem Ammoniak gelingt) lohnt sich der Mehraufwand, der mit der Darstellung dieser beiden letztgenannten Aminosäurederivate verbunden ist, nicht. Durch geeignete N^{im}- und N^{G}-Schutzgruppen würden sie jedoch stark an Bedeutung gewinnen.

Der t-Butyloxycarbonylrest ist wegen der schon oben erwähnten Vorteile der zur Zeit geeignetste α-Aminoschutz für das hier vorliegende Syntheseproblem.

3.1.2. Permanente Maskierung funktioneller Gruppen in den Seitenketten

Die trifunktionellen Aminosäuren der B-Kette sind: Arginin, Histidin, Cystein, Threonin, Tyrosin, Serin, Lysin und Glutaminsäure.

Als Guanidoschutz bei der Festkörpersynthese wurden bisher nur der Nitro- und Tosylrest beschrieben. Der Nitrorest muß hydrogenolytisch abgespalten werden und kann daher für die Synthese cysteinhaltiger Peptide nicht verwendet werden. Der einzige geeignete Schutz für die Imidazolfunktion des Histidins ist der Benzylrest. Sowohl der N^{im}-Schutz des Histidins, als auch der N^{G}-Schutz des Arginins müssen mit Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten werden.

Dieser Umstand erleichterte die Wahl des Benzylrestes als Thiolschutzgruppe sehr. Neben dem Benzylrest wurde bisher nur die S-Äthylmercaptogruppe als ein für die Trägersynthese geeigneter Cysteinschwefelschutz beschrieben (I n u k a i et al. [123]).

Die einzige Möglichkeit, die Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak, die zur Zerstörung des Moleküls führen kann [124,125], bei der Synthese der B-Kette zu umgehen, wäre, Histidin und Arginin mit ungeschützter Seitenkettenfunktion einzusetzen und den Cysteinschwefel mit der S-Äthylmercaptogruppe zu schützen. Zwar wurden M e r r i f i e l d - Synthesen mit ungeschütztem Arginin und Histidin beschrieben

(L o f f e t [81]), doch erschien ein solcher Schritt für die Synthese eines Peptides, das aus 3o Aminosäuren zusammengesetzt ist, zu riskant.

Die Hydroxylfunktionen von Tyrosin und Serin wurden als Benzyläther maskiert während Threonin ungeschützt eingesetzt wurde. Zum Schutz der ε-Aminogruppe von Lysin wurde diese carbobenzoxyliert, die w-Carboxylgruppe der Glutaminsäure als Benzylester blockiert.

3.1.3. Knüpfung der Peptidbindung

Zur Verlängerung der an den Träger gebundenen Peptidkette boten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Die Ankondensation der Aminosäure mit DCCI
2. Umsetzung mit einem aktivierten Ester der anzukondensierenden Aminosäure.

M e r r i f i e l d [61] wollte ursprünglich die Synthese mit aktivierten Acylaminosäureestern durchführen, fand jedoch bei Zimmertemperatur ungenügenden Umsatz und bei Erhöhung der Temperatur Racemisierung. Inzwischen wurde über Festkörperpeptidsynthesen mit aktivierten Estern berichtet (K l o s t e r m e y e r et al. [68,9o], B e y e r m a n n et al. [74], H ö r n l e [75]).

1967 veröffentlichte H ö r n l e [75] eine Synthese der Insulin A-Kette unter ausschließlicher Verwendung von t-BOC-Aminosäure-p-nitrophenylestern. Bei 2 - 3 fachem Überschuß

an Carboxylkomponente und 12 - 16 stündiger Reaktionszeit wurde eine durchschnittliche Umsatzrate von 94 % gefunden. Von B e y e r m a n n und Mitarbeitern [74,95] wurde 1,2,4-Triazol als bifunktioneller Katalysator bei der Umsetzung mit aktivierten Estern eingeführt.
K l o s t e r m e y e r et al. [90] versuchten Gramicidin S aus N-Hydroxysuccinimidestern von Acylaminosäuren aufzubauen, doch nimmt die Umsatzrate mit wachsender Kettenlänge rasch ab.

Bei der Umsetzung mit aktivierten Estern sind Reaktionszeiten von 24 Stunden und mehr erforderlich. Mit DCCI wird die Ankondensation der Aminosäuren wesentlich schneller erreicht. Außerdem fällt die Darstellung der oft schwer zugänglichen t-BOC-Aminosäure-p-nitrophenylester weg. Daher wurde der DCCI-Methode zur Kettenverlängerung der Vorzug gegeben.

Die zwei Aminodicarbonsäuren mit amidierter w-Carboxylfunktion Asparagin und Glutamin müssen wegen der Gefahr der Dehydratisierung zum Nitril bei der Ankondensation mit DCCI als p-Nitrophenylester aktiviert werden.

3.1.4. Darstellung der Aminosäurederivate

Bei der Darstellung der t-Butyloxycarbonylaminosäuren wurde nach einem von S c h n a b e l [126] beschriebenen Verfahren vorgegangen.
Die zu acylierende Aminosäure wurde in einem Dioxan/Wasser-Gemisch 1:1 gelöst oder suspendiert und bei einem bestimmten,

für die einzelnen Aminosäuren verschiedenen pH-Wert im Autotitrator mit einem geringen Überschuß von t-Butyloxycarbonylazid umgesetzt. Die t-BOC-Aminosäuren fallen in guten Ausbeuten und sehr rein an. Sie wurden entweder direkt kristallin erhalten oder über die Dicyclohexylammoniumsalze gereinigt.

Als Reinheitskriterien wurden herangezogen: Dünnschichtchromatographie in den Systemen Butanol/Wasser 4 : 1, Chloroform/Methanol/Eisessig 35 : 35 : 3o und n-Heptan/t-Butanol/Pyridin 3 : 1 : 1; Stickstoffanalyse, Schmelzpunkt und optische Aktivität.

Um eine Racemisierung während der Acylierung ganz ausschließen zu können, wurde an einer Probe der t-BOC-Rest mit HCl/Eisessig abgespalten und die optische Drehung der erhaltenen Aminosäuren mit authentischem Material verglichen.

Zur Darstellung von O-Benzyltyrosin (W ü n s c h et al.[127]) wurde der L-Tyrosin-Kupferkomplex, der aus Tyrosin und $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in Natronlauge erhalten wurde, mit Benzylbromid in NaOH und Äthanol umgesetzt. Verreiben des O-Benzyltyrosin-Kupfers mit verdünnter HCl und Umkristallisieren aus 8o %-iger Essigsäure ergab reines O-Benzyltyrosin.

Um den Carbobenzoxyrest an der ε-Aminogruppe des Lysins einzuführen, wurden die α-Amino- und Carboxylgruppe durch Bildung eines Kupferkomplexes maskiert. Dieser wurde in wässriger Natriumbicarbonatlösung mit Carbobenzoxychlorid

zur Reaktion gebracht. Zur Zerstörung des Kupferkomplexes wurde in die salzsaure Lösung H_2S eingeleitet und das ausgeschiedene Kupfersulfid abfiltriert. Nach Einstellung auf einen pH-Wert von 7 fällt ε-Aminocarbobenzoxy-L-lysin aus (N e u b e r g e r et al. [128]). Histidinhydrochlorid wurde in Natrium/flüssigem Ammoniak nach Du V i g n e a u d und B e r e n s [129] zu N^{im}-Benzyl-L-histidin umgesetzt. Nach Entfernung des Ammoniaks wurde mit Wasser aufgenommen, auf pH 8 gebracht und das Produkt auskristallisiert. S-Benzyl-L-cystein (H a r r i n g t o n und M e a d [130]) wurde durch direkte Benzylierung mit Benzylbromid erhalten. O-Benzyl-L-serin (G r a s s m a n n et al. [131]) kann nicht durch direkte Verätherung gewonnen werden. Von Acrylsäureäthylester ausgehend wurde N-Acetyl-DL-serin synthetisiert. Enzymatisch wird nun von der L-Form der Acetylrest abgespalten. O-Benzyl-L-serin konnte dann von N-Acetyl-O-benzyl-D-serin getrennt werden.

Um N^G-Tosyl-L-arginin (Z e r v a s et al. [132], R a c h m a c h a n d r a n und L i [133]) zu bekommen, mußte zuerst die Aminogruppe mit dem Cbo-Rest geschützt werden, der nach Einführung der Tosylgruppe hydrogenolytisch wieder abgespalten wurde.

Die p-Nitrophenylester von t-BOC-L-Tyrosin (Z a h n et al.[134]), t-BOC-L-Glutamin (Z a h n et al.[134]) und t-BOC-L-Asparagin (S c h r ö d e r und K l i e g e r [135]) wurden durch Umsetzung der t-BOC-Aminosäuren mit p-Nitrophenol und DCCI erhalten.

3.2. Synthese von Decapeptiden der C-terminalen Sequenz der Rinderinsulin B-Kette (B_{21} - B_{30})

3.2.1. Synthese des Decapeptides mit DCCI in DMF

Als Träger wurde ein Copolymerisat aus Styrol/1 % Divinylbenzol verwendet, das durch Behandlung mit Zinn(IV)Chlorid und Chlormethylmethyläther chlormethyliert wurde (M e r r i f i e l d [61]). Der Chlorgehalt betrug 7,48 % entsprechend 2,22 mMol Chlor pro Gramm Harz.

Verestert wurde mit äquimolaren Mengen t-Butyloxycarbonylalanin und Triäthylamin in siedendem Äthanol.

Zur Bestimmung der Ausbeuten ist es notwendig, den genauen Aminosäuregehalt des Harzes zu wissen. Auch bildet dieser Wert die Grundlage für die Menge, die an Aminosäure und DCCI zur Kupplung eingesetzt werden muß.

Quantitative Aminosäureanalyse eines Harzhydrolysates zeigte, daß o,8 mMol t-BOC-Alanin pro Gramm Harz gebunden wurden. Kjeldahlanalyse gab mit 1,5 % Stickstoffgehalt, das entspräche 1,o7 mMol Aminosäure pro Gramm Harz, einen zu hohen Veresterungsgrad an. Etwa o,2 mMol Chlor haben in unerwünschter Weise reagiert.

B e y e r m a n und Mitarbeiter [74] fanden, daß Triäthylamin unter den Bedingungen der Veresterung mit den Chlormethylgruppen zu quarternären Ammoniumverbindungen reagiert, und daß daraus der zu hohe Stickstoffwert resultiert.

Quantitative Aminosäureanalyse eines Totalhydrolysates des Decapeptides vom Harz lieferte durchwegs niedrigere Werte für die erste mit dem Träger veresterte Aminosäure (Alanin). Höhere Werte erhielt man, wenn nur t-BOC-Ala-Harz hydrolysiert und der Aminosäuregehalt nach S p a c k m a n , S t e i n und M o o r e [136] bestimmt wurde.

Tabelle 2: Alaningehalt des Harzes nach Hydrolyse der Decapeptide.

Decapeptid	mMol Ala n.Hydrolyse des Peptides vom Harz	mMol Ala nach der Veresterung bestimmt
I	o,5o mMol/g	o,8 mMol/g
II	o,57 "	"
V	o,68 "	"
VI	o,52 "	"

B e y e r m a n et al. [74] beobachteten gleiches. Sie nehmen an, daß unter den Hydrolysebedingungen zuerst die Esterbindungen und dann erst die Peptidbindungen gespalten werden und nicht alles mit dem Träger veresterte Peptid abgespalten wird. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Tatsache bei der Ausbeutenberechnung nicht berücksichtigt.

Der t-BOC-Rest wurde mit 1 N HCl in Eisessig abgespalten. Das Harz wurde je dreimal mit Eisessig, absolutem Äthanol und wasserfreiem DMF gewaschen und das Hydrochlorid mit Triäthylamin in DMF in die freie Base überführt. Nach Waschen mit DMF

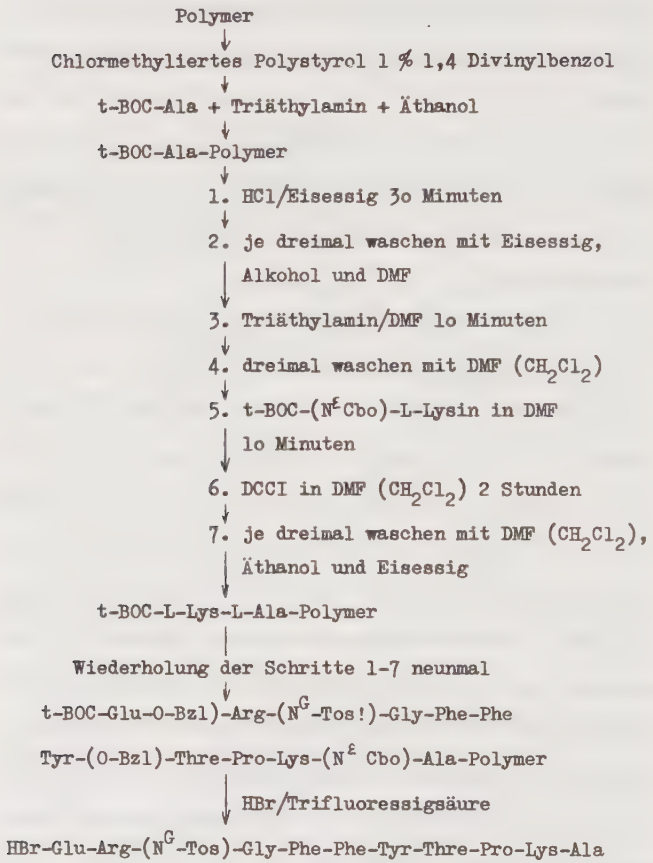
oder DMF und Methylenchlorid folgte der erste Kupplungsschritt.

Die Ankondensation der N-geschützten Aminosäuren erfolgte in DMF; nur t-BOC-Prolin wurde immer in Methylenchlorid gekuppelt.

Die Carboxylkomponente und DCCI wurden in 3,6 fachem Überschuß eingesetzt. Nach zweistündiger Reaktion wurde überschüssiges Reagenz abfiltriert und je dreimal mit DMF, Äthanol und Eisessig gewaschen.

Dieser Zyklus - Deblockierung der Aminogruppe, Freisetzen der Base und Kondensation einer t-BOC-Aminosäure mit DCCI - wurde solange wiederholt, bis t-BOC-L-Glu(γ-Bzl)-N^G-Tosyl-L-Arg-L-Gly-L-Phe-L-Phe-(O-Bzl)-L-Tyr-L-Thre-L-Pro-(N^ε-Cbo)-L-Lys-L-Ala-Polymer aufgebaut war. Mit HBr/Trifluoressigsäure wurde das Decapeptid vom Harz abgespalten. Dabei wurde auch der Cbo-Rest von Lysin, der O-Bzl-Rest von Tyrosin und großteils der γ-Benzylester der Glutaminsäure entfernt. Katalytische Hydrierung mit Palladium/Kohle in Methanol/Eisessig/Wasser 7:4:1 führte restlichen Glutaminsäure-γ-benzylester in die freie Säure über. Durch zweimaliges Umfällen aus Trifluoressigsäure mit Äther und Umkristallisieren aus Äthanol wurde das Decapeptid gereinigt.

Schema zur Merrifield-Synthese:



Dünnschichtchromatographisch ließ sich das Tosyldecapeptid-hydrobromid in zwei Laufmitteln (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 und Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 3o : 2o : 4 : 26 alle v/v) in zwei Komponenten auftrennen. Ein Dünnschichtchromatogramm des Rohproduktes zeigte sogar 6-7 verschiedene Spots. Eine derartige Vielzahl von Nebenprodukten ließ schon die Aminosäureanalyse eines Totalhydrolysates vom Harz erwarten:

Aminosäureanalyse von I Totalhydrolysat vom Harz
(36 Stunden, 6 N HCl, 11o°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,o	o,93	o,86	o,66	o,46	1,1o	o,64	o,44	o,46

Eine zweite Synthese (II) unter denselben Bedingungen, wie sie oben beschrieben wurden, lieferte ein ähnliches Ergebnis:

Aminosäureanalyse von II Totalhydrolysat vom Harz
(36 Stunden, 6 N HCl, 11o°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,o	o,94	o,9o	o,84	o,37	1,1o	o,56	o,38	o,47

Aus der Aminosäureanalyse kann ersehen werden, daß die Aminosäuren Threonin und Tyrosin besonders schlecht kuppeln und die dem Tyrosin folgenden Aminosäuren Phe, Gly, Arg und Glu in etwa molarem Verhältnis zu Tyrosin ankondensieren.

3.2.2. Synthese des Decapeptides mit Dicyclohexylcarbodiimid/ N-Hydroxysuccinimid in Dimethylformamid (III, IV)

Die Kombination von DCCI mit N-Hydroxysuccinimid zur Kupplung von Aminosäuren, von W ü n s c h und D r e e s [137] für die klassische Peptidsynthese beschrieben, wurde von W e y g a n d [84] für die M e r r i f i e l d - Methode übernommen. Damit gelingt die racemisierungsfreie Ankondensation eines N-Acylpeptides. Bei dem bisher angewendeten schrittweisen Verfahren soll diese Technik vollständigen Umsatz bei geringerem Überschuß an N-Acyl-Aminosäure gewährleisten.
Der Reaktionszyklus zur Ankondensation einer Aminosäure ist der gleiche, wie er schon beschrieben wurde; nur wurde in Gegenwart von N-Hydroxysuccinimid mit DCCI gekuppelt. Die Kupplung mit überschüssiger geschützter Aminosäure erfolgte in DMF, nur Prolin wurde in Methylenchlorid ankondensiert. Die Molverhältnisse betrugen bei den geschützten Aminosäuren und DCCI 2,88 mMol und 5,76 mMol für N-Hydroxysuccinimid je o,8 mMol trägergebundenem Alanin. Die Aminosäureanalyse zeigte, daß schon nach vier Kupplungsschritten der Umsatz unter lo % gesunken war.

Aminosäureanalyse von III (s.o.) Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, llo°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Berg.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,o	o,86	o,69	o,32	o,o6	o,11	o,o6	-	-

Verlängerung der Reaktionszeit auf 22 Stunden unter sonst gleichen Bedingungen wie bei der Synthese von III verbesserte das Ergebnis nicht wesentlich, siehe IV.

Aminosäureanalyse von IV, Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,0	0,74	0,54	0,31	0,10	0,15	0,06	-	0,04

Intermediär entstehen bei der DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Methode N-Hydroxysuccinimidester. Bei sterisch gehinderten N-Acylaminosäuren ist die Veresterungsgeschwindigkeit relativ gering; so kann aus DCCI und N-Hydroxysuccinimid bevorzugt Succinimidoxycarbonyl-ß-alanin-N-hydroxysuccinimidester gebildet werden (W e y g a n d et al. [138]). Da auf diese Weise die Umsetzung des N-Hydroxysuccinimids der Peptidbildung den Rang ablaufen kann, wird verständlich, warum die Umsatzraten mit wachsender Kettenlänge so rasch abnehmen.

3.2.3. Synthese des Decapeptides unter Verwendung von t-BOC-O-Bzl-Tyrosin-p-Nitrophenylester (V)

Um eventuelle Nebenreaktionen bei der Ankondensation von Tyrosin mit der Hydroxylgruppe des Threonins zu vermeiden, wurde der p-Nitrophenylester von t-BOC-O-Bzl-Tyrosin eingesetzt. Alle anderen Reaktionsschritte wurden, wie unter I beschrieben, beibehalten.

Während 24 Stunden wurde Threonyl-prolyl-(N^{ε} Cbo)-lysyl-alanyl-Polymer mit dem aktivierten Ester von t-BOC-O-Bzl-Tyrosin in DMF umgesetzt. Die Aminosäureanalyse dieses Peptides entsprach innerhalb der Fehlergrenzen der von I und II.

Aminosäureanalyse von V Totalhydrolysat vom Harz
(36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,0	0,95	0,87	0,54	0,33	1,18	0,59	0,54	0,44

Ob Tyrosin mit DCCI oder über den aktivierten Ester ankondensiert wurde, hatte keinen Einfluß auf die Umsatzrate. Daraus kann gefolgert werden, daß bei der Kupplung mit DCCI in DMF keine Reaktionen mit der freien Hydroxylgruppe des Threonins (z.B. Veresterung) auftreten, oder nur zu einem so geringen Prozentsatz, der durch die Aminosäureanalyse nicht mehr erfaßt werden kann.

3.2.4. Methylenchlorid als Lösungsmittel für die Kupplungsreaktion (VI)

Bessere Umsatzraten wurden erreicht, erfolgte die Ankondensation der N-geschützten Aminosäuren nicht in DMF sondern in Methylenchlorid. Threonin und Tyrosin kondensieren auch nicht in den gewünschten Ausbeuten an doch wurde eine Steigerung der Umsatzraten um 10 - 20 % beobachtet. Eine deutliche Steigerung der Umsatzraten wurde für die nachfolgenden Aminosäuren Glycin, Arginin und Glutaminsäure erzielt.

Aminosäureanalyse von VI Totalhydrolysat vom Harz
(36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,o	o,91	o,81	o,76	o,62	1,32	1,13	o,87	1,o6

Die besseren Umsatzraten in Methylenchlorid als Kupplungsmedium können auf eine von S h e e h a n [71] gemachte Beobachtung zurückgeführt werden. Die Bildung von N-Acylharnstoff aus den aktivierten Aminosäureintermediärprodukten ist in Methylenchlorid sehr gering.

Nach dem von K h o r a n a [139] aufgestellten Reaktionsmechanismus für die Bildung der Peptidbindung mit DCCI, wird die N-Acylharnstoffbildung durch Basen katalysiert. DMF unterliegt bereits bei Zimmertemperatur einer langsamen Spaltung in Dimethylamin und Formaldehyd. Dimethylamin, eine relativ starke Base ,lenkt die Reaktion in Richtung der N-Acylharnstoffbildung und damit zu schlechten Ausbeuten der Peptidbildungsreaktion.

Tabelle 3:
Aminosäureanalysen der Decapeptide nach Hydrolyse vom Harz
(36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
	1	1	1	1	1	2	1	1	1
I	1,o	o,93	o,86	o,66	o,46	1,1o	o,64	o,44	o,46
II	1,o	o,94	o,9o	o,84	o,37	1,1o	o,56	o,38	o,47
III	1,o	o,86	o,69	o,32	o,o6	o,11	o,o6	-	-
IV	1,o	o,74	o,54	o,31	o,1o	o,15	o,16	-	o,o4
V	1,o	o,95	o,87	o,54	o,33	1,18	o,59	o,54	o,44
VI	1,o	o,91	o,81	o,76	o,62	1,32	1,13	o,87	1,o6

Wenn man die Aminosäureanalysen der Peptide die in DMF synthetisiert wurden I, II, V, betrachtet (Tabelle 3), so kann man feststellen, daß die Umsatzraten beim dritten und vierten Kupplungsschritt abnehmen. Die auf das Tyrosin folgenden Aminosäuren kuppeln aber in etwa molarem Verhältnis zu Threonin an. Man kann annehmen, daß Peptidstümpfe mit freier Aminogruppe des Prolins und Lysins nicht mehr weiter reagieren. Die Aminogruppen des Threonins, die nicht mit Tyrosin reagiert haben, scheinen jedoch bei der nächsten Kupplung umgesetzt zu werden.

In Methylenchlorid als Kupplungsmedium (VI) sind die Verhältnisse etwas anders gelagert. Die Ankondensation von Threonin und Tyrosin verläuft auch nicht mit den erwünschten Umsatzraten. Im Mittel hat nur soviel Phenylalanin mit der vorhergehenden Aminosäure reagiert, wie Tyrosin in der Peptidkette vorhanden ist (berücksichtigt man, daß ein gewisser Prozentsatz an Tyrosin bei der Säurehydrolyse zerstört wird). Da nun aber der Wert für das den zwei Phenylalaninen folgende Glycin wieder um 1 ist, muß diese Aminosäure mit vorher nicht umgesetzter Aminkomponente reagiert haben. Diese auffallend starke Tendenz zur Bildung von Fehlsequenzen wurde in DMF nicht beobachtet.

3.3. Sequenzvariierte Decapeptide

Austausch von Prolin, Threonin, Lysin und Prolin + Threonin gegen Alanin soll zeigen, ob die schlechten Umsatzraten bei der Ankondensation durch die als Carboxylkomponente oder die als Aminkomponente fungierende Aminosäure bedingt werden.

3.3.1. Austausch von Prolin gegen Alanin (VII)

Für die schlechte Umsatzrate bei der Ankondensation von Threonin wurde Prolin wegen seiner sekundären Aminogruppe verantwortlich gemacht. Austausch gegen Alanin sollte nun zeigen, ob tatsächlich die strukturelle Eigenart des Prolins die schlechten Ausbeuten bei diesem Schritt der Synthese bedingt. Jedoch auch an diese Aminosäuresequenz Ala-N^{ε}-Cbo-Lys-Ala-P kuppelt Threonin mit gleich geringem Umsatz an, wie an Pro-N^{ε}-Cbo-Lys-Ala-P.

Aminosäureanalyse von VII Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	2	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,85	1,0	0,57	0,37	1,00	0,57	0,54	0,65

Bei der Synthese dieses Decapeptides wurde noch DMF als Lösungsmittel für die Kupplungsreaktion verwendet, für die Synthesen der unten beschriebenen Decapeptide nur mehr Methylenchlorid.

3.3.2. Austausch von Threonin gegen Alanin (VIII)

Bei der Synthese dieses Decapeptides wurde deutlich, daß sehr wohl Alanin besser als Threonin an Prolin kuppelt. Tyrosin aber an Alanin mit gleich niedrigem Umsatz ankondensiert. Die weitere Kettenverlängerung zum Decapeptid verlief mit den selben Umsatzraten, wie sie schon vorher beschrieben wurden (VI).

Nicht die Aminkomponente allein scheint die Ursache für den zu geringen Umsatz bei der Ankondensation von Threonin zu sein, sondern es muß auch die Carboxylkomponente einen Einfluß auf die Ausbeuten des Kondensationsschrittes haben. Das gleiche trifft auch für Tyrosin zu, da es mit gleich geringen Ausbeuten an Alanin wie an Threonin ankondensiert.

Aminosäureanalysen von VIII Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Pro	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	2	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	1,91	1,o	o,82	o,46	1,39	o,85	o,89	o,87

3.3.3. Austausch von Prolin und Threonin gegen Alanin (IX)

Quantitative Kondensation von Tyrosin an das Tetrapeptid Ala-Ala-N$^{\varepsilon}$-Cbo-Lys-Ala-P gelang unter den bisherigen Bedingungen (3,6 facher Tyrosinüberschuß und eine Reaktionszeit von 2 Stunden) nicht. Ausreichender Umsatz bei der Ankondensation des Tyrosins an diese Sequenz wurde erst erreicht, wenn die Reaktionsbedingungen geändert wurden. t-BOC-O-Bzl-L-Tyrosin und DCCI wurden in sechs fachem Überschuß eingesetzt. Nach 22 stündiger Reaktionszeit wurde abgesaugt, mit Methylenchlorid, Äthanol und Methylenchlorid gewaschen, t-BOC-O-Bzl-Tyrosin und DCCI in sechsfachem Überschuß zugegeben und wieder 22 Stunden reagieren gelassen. Nachdem dies nochmals wiederholt worden war, also das Tetrapeptid insgesamt dreimal mit geschütz-

tem Tyrosin umgesetzt worden war, wurde der t-BOC-Rest abgespalten und die folgende Aminosäure ankondensiert.

Aminosäureanalyse von IX Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	3	1	1	2	1	1	1
Gef.:	3,10	1,0	0,72	1,90	0,89	0,81	0,87

Bei der Ankondensation von Tyrosin nach der oben beschriebenen Modifikation wurde eine Erhöhung der Umsatzrate um 10 % erreicht. Daß es sich um keinen Artefakt handelt, beweist die Synthese eines weiteren Decapeptides (X), wobei Tyrosin wie oben gekuppelt wurde. Zwar wurde in diesem Peptid noch zusätzlich Arginin gegen Alanin ausgetauscht, doch kann dieser Austausch die Ankondensation von Tyrosin nicht beeinflussen, da Tyrosin vier Reaktionszyklen vorher ankondensiert wurde.

Aminosäureanalyse von X Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Tyr	Phe	Gly	Glu
Ber.:	4	1	1	2	1	1
Gef.:	4,15	1,0	0,75	1,94	0,95	0,96

Daß mehrmaliges Umsetzen mit derselben Aminosäure die Ausbeute des Kupplungsschrittes erhöht, wurde inzwischen auch von W e y g a n d und O b e r m e i e r [83] beschrieben.

3.3.4. Austausch von Prolin und Threonin gegen Alanin und Tyrosin gegen Phenylalanin (XI)

Die Ankondensation von Phenylalanin an das Tetrapeptid Ala-Ala-Lys-Ala-P verlief mit ausgezeichneter Ausbeute:

Aminosäureanalyse von XI Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Lys	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	3	1	3	1	1	1
Gef.:	3,10	1,0	3,18	1,04	0,94	0,96

Die schlechten Umsatzraten bei der Ankondensation von Tyrosin werden also nur von dieser Aminosäure selbst verursacht.

3.3.5. Austausch von Lysin gegen Alanin

Ein sehr überraschendes Ergebnis lieferte dieser Austausch. Für alle Kupplungsschritte wurden gute Umsatzraten gefunden.

Aminosäureanalyse von XII Totalhydrolysat vom Harz (36 Stunden, 6 N HCl, 110°C)

	Ala	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
Ber.:	2	1	1	1	2	1	1	1
Gef.:	2,00	0,89	0,76	0,70	1,96	0,98	0,91	0,89

Eine so hohe Umsatzrate bei der Ankondensation von Tyrosin wurde bisher nur durch mehrmaliges Umsetzen und da nur an die Sequenz Ala-Ala-Lys-Ala-P, erreicht. Eine mögliche Erklärung

für die besseren Umsatzraten nach Austausch von Lysin wäre: Lysin hat eine sehr lange Seitenkette. Zur Synthese muß die ε -Aminogruppe mit dem Cbo-Rest, einer voluminösen Gruppe, geschützt werden. Seitenkette und Cbo-Rest kann, wegen der großen räumlichen Ausdehnung, die Annäherung einer anderen Aminosäure im Kondensationsschritt behindern.

Tabelle 4: Aminosäureanalysen der gereinigten Decapeptide

	I	II	III	V	VI	theoret.
Ala	1,oo	1,oo	1,oo	1,oo	1,oo	1
Lys	o,89	1,o5	o,93	o,85	o,99	1
Pro	o,97	1,oo	o,68	o,95	o,94	1
Thre	o,92	1,o5	o,34	o,74	1,o3	1
Tyr	o,56	o,68	o,17	o,74	o,78	1
Phe	2,o4	2,1o	o,28	1,92	2,o7	2
Gly	1,o4	1,o9	o,12	o,95	1,o6	1
Arg	o,86	1,oo	o,o7	o,95	o,98	1
Glu	o,9o	1,oo	o,o5	o,92	1,o2	1

Als Bezugspunkt wurde die carboxylendständige Aminosäure Alanin gewählt.

Tabelle 5: Ausbeuten in %

	nach Abspaltung und Umfällen	berechnet aus der Aminosäureanalyse
I	68	74
II	8o	82
III	52	3o
IV	58	3o
V	71	74
VI	85	94

3.4. Synthese der Rinder B-Kette (1)

Die B-Kette des Rinderinsulins wurde analog M a r g l i n und M e r r i f i e l d [62] am polymeren Träger aufgebaut. Begonnen wurde mit o,4 mMol t-BOC-Ala-Harz (o,5 g). 29 mal wurde der Zyklus der drei M e r r i f i e l d - Stufen - Abspalten des t-BOC-Restes, Freisetzen der Aminkomponente und Ankondensation der nächsten geschützten Aminosäure - wiederholt, bis das Triacontapeptidylharz der B-Kette t-Butyloxycarbonyl-phenylalanyl-valyl-asparaginyl-glutaminyl-N^{im}-benzylhistidyl-leucyl-S-benzylcysteinyl-glycyl-O-benzyl-seryl-N^{im}-benzylhistidyl-leucyl-valyl- γ-benzylglutamyl-alanyl-leucyl-O-benzyltyrosyl-leucyl-valyl-S-benzylcysteinyl-glycyl- γ-benzylglutamyl-N^{G}-tosylarginyl-glycyl-phenyl-alanyl-phenylalanyl-O-benzyltyrosyl-threonyl-prolyl-N^{ε}-benzyloxycarbonyllysyl-alanyl-Harz aufgebaut worden war. Zum Aufbau des Polypeptides am Harz wurden folgende Aminosäuren mit geschützter Seitenkettenfunktion eingesetzt: t-BOC-Glu- γ-Bzl, t-BOC-S-Bzl-Cys, t-BOC-N^{im}-Bzl-His, t-BOC-O-Bzl-Ser, t-BOC-O-Bzl-Tyr, t-BOC-N^{G}-Tos-Arg und t-BOC-N^{ε}-Cbo-Lys. Die sekundäre Hydroxylgruppe des Threonins wurde nicht blockiert. Als Lösungsmittel für die t-BOC-Aminosäuren wurde Methylenchlorid verwendet, nur die darin unlöslichen Aminosäurederivate t-BOC-N^{im}-Benzylhistidin, t-BOC-Asparagin- und t-BOC-Glutamin-p-nitrophenylester wurden in DMF ankondensiert.

Alle Kupplungsschritte wurden mit DCCI ausgeführt, nur die Ankondensation von Glutamin und Asparagin wurde, um Nitrilbildung zu vermeiden, über die p-Nitrophenylester erreicht.

Nach Abspalten vom Träger mit HBr/Trifluoressigsäure und zweimaligem Umfällen aus Trifluoressigsäure mit Äther wurde das teilweise geschützte Triacontapeptid mit 54 %iger Ausbeute erhalten. Um die Abspaltung der restlichen Schutzgruppen zu erreichen, wurde das teilweise geschützte Peptid in flüssigem Ammoniak gelöst und eine Lösung von Natrium in flüssigem Ammoniak zugetropft, bis die blaue Farbe für 15 - 2o Sekunden bestehen blieb. Bei einer so kurzen Reaktionszeit wird das Ausmaß der Spaltung der Threonin-Prolinbindung $B_{27} - B_{28}$ auf 2o bis 25 % reduziert (M a r g l i n und M e r r i f i e l d [62]). Danach wurde das Triacontapeptid durch oxydative Sulfitolyse in das S-Sulfonat überführt. Durch Dialyse gegen dest. Wasser wurde das S-Sulfonat entsalzt. Die Gesamtausbeute, nach Lyophilisation bezogen auf die erste mit dem Harz veresterte Aminosäure betrug 25 %.

Das S-Sulfonat wurde säulenchromatographisch über Sephadex G 5o (2,2 x 7o cm) gereinigt. Eluiert wurde mit einem o,ol N Ammoniumbicarbonatpuffer pH 9.

Das Eluationsdiagramm ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die UV-Absorptionskurze zeigte drei Peaks.

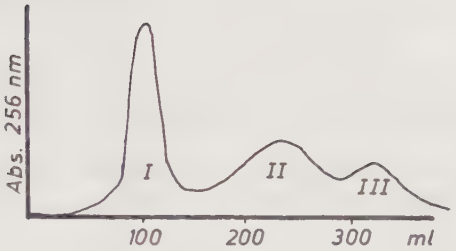


Abb. 1: Chromatographie der synth. Buntesalz-Kette auf einer 2,2 x 7o cm Sephadex G 5o Säule, o,ol N NH_4HCO_3 pH 9

Peak I erscheint nach llo ml und ist ein polymeres Produkt folgender Aminosäurezusammensetzung:

	Asp	Thre	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Leu
Ber.:	1	1	1	3	1	3	2	2	3	4
Gef.:	o,11	1,o3	o,62	2,41	2,o5	3,24	2,14	+	2,27	4,o6

Tyr	Phe	Lys	His	Arg
2	3	1	2	1
1,99	2,82	2,13	2,o6	2,81

Bezogen wurde auf Glu, Gly und Ala; + = nicht bestimmt

Peak II wurde an derselben Stelle eluiert wie B-S-Sulfonat-kette, die aus natürlichem Rinderinsulin gewonnen worden war. Nach Gefriertrocknung und Hydrolyse wurde folgende Aminosäure-zusammensetzung gefunden:

	Asp	Thre	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Ber.:	1	1	1	3	1	3	2	2	3
Gef.:	o,67	1,12	o,7o	2,73	1,o7	2,91	2,24	+	3,54

Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg
4	2	3	1	2	1
3,84	2,12	3,16	1,oo	1,51	o,97

Bezogen wurde auf Lysin; + = nicht bestimmt.

Der Salzpeak III ist etwas mit ninhydrinpositivem Material verunreinigt, wurde aber nicht näher untersucht. Elektrophoretisch (4 M Harnstoff/15 % Ameisensäure/1o % Essigsäure) war das aus Peak II erhaltene Produkt mit natürlicher Rinder-B-S-Sulfonatkette identisch. Neben der Hauptbande wurde noch eine zweite, schwache Bande mit etwas größerer Wanderungsgeschwindigkeit gefunden.

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurde die synthetische S-Sulfonatkette mit natürlicher Rinder-A-Kette rekombiniert. Das Kombinationsprodukt wurde ohne weitere Reinigung in Puffer aufgenommen und im Mäusefall- und Fettkörpertest geprüft. Als mittlere Aktivität wurden o,5 %, bezogen auf die eingesetzte B-Kette erhalten.

3.5. Variierte B-Ketten

B-Ketten mit abgewandelter Sequenz wurden analog 1 synthetisiert und zu Hybridinsulinen rekombiniert. Die biologische Aktivität der synthetischen Rinder-B-Kette wurde als Bezugssystem verwendet. In Abb. 2 sind alle synthetisierten Ketten und in Tabelle 6 die nach Kombination erhaltenen Aktivitäten zusammenstellt.

Zeigt das Hybridinsulin mit variierter B-Kette gleiche Wirkung wie dasjenige mit synthetischer B-Kette natürlicher Sequenz, so kann angenommen werden, daß die ausgetauschte Aminosäure für die biologische Wirkung nicht notwendig ist. Geht die Wirkung verloren, so können dafür vor allem zwei Gründe vorhanden sein: 1. Die Aminosäure ist essentiell und 2. der Austausch behindert die Kombination.

3.5.1. Austausch von Prolin B 28 und Threonin B 27 gegen Alanin

Nicht alle bekannten natürlichen Insuline besitzen Prolin in B 28. Daher wurde mit dem Austausch dieses Prolins gegen Alanin begonnen (Kette 2). Diese Sequenzänderung zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität.

In Kette 3 wurde Threonin gegen Alanin ausgetauscht. Die biologische Wirkung blieb erhalten. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da nicht alle Speziesinsuline an dieser Stelle Threonin besitzen. Auch war bei Veresterung der aliphatischen Hydroxylgruppen mit Schwefelsäure (G l e n d e n i n g et al. [9]) keine Aktivitätsminderung beobachtet worden.

Da sowohl Threonin als auch Prolin ohne Aktivitätsverlust ausgetauscht werden konnten, müßte auch der Austausch beider zugleich gegen Alanin keinen Aktivitätsverlust bringen. In Kette 4 wurde diese Sequenz verwirklicht und die Annahme bestätigt, daß beide Aminosäuren gleichzeitig ohne Wirkungsminderung ausgetauscht werden können.

3.5.2. Austausch von Lysin und Histidin

3.5.2.1. Austausch von Lysin B 29 gegen Alanin (5)

Chemische Modifizierung des Lysinrestes (E v a n s und S o r o f f [34], L i [35]) am Gesamtmolekül führte zu keinem Wirkungsverlust. Auch K a t s o y a n n i s [14o] berichtete über ein voll wirksames Des-Pro-Lys-Ala (Des-B 27 - B 3o) Insulin.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde ein wirksames Hybridinsulin erhalten, bei dem Lysin B 29 gegen Alanin ausgetauscht war (Kette 5).

3.5.2.2. Austausch der Histidin B 5 und B 1o gegen Alanin

Nur im Meerschweinchen wird eine Tierart gefunden, dessen Insulin in B 1o statt Histidin Asparagin besitzt. Aufschluß über die Notwendigkeit des Histidins in dieser Position kann daraus jedoch nicht gewonnen werden, da die Aminosäuresequenz des Meerschweincheninsulins die meisten Unterschiede zu den

anderen Speziesinsulinen aufweist und seine biologische Wirkung weit unter der der anderen bekannten Insuline liegt. Aus Photooxydationsversuchen (W e i t z e l [36], W e i l [37]) wurde zumindest ein Histidinrest als essentiell erkannt. Ein Hybridinsulin aus synthetischer Ala 28 Ala lo B-Kette und natürlicher A-Kette zeigte gleiche Aktivität wie synthetische B-Kette natürlicher Sequenz, sowohl im Mäusefall- als auch im Fettkörpertest (Kette 6).

Histidin in B 5 besitzen alle bekannten natürlichen Insuline. Es war nun zu erwarten, daß Austausch dieses Histidinrestes gegen Alanin zum Wirkungsverlust führt, zumal auch H u m - b e l [38] diesem Histidin essentiellen Charakter zuschreibt.

Erstaunlicherweise zeigte auch das Hybridinsulin mit einer B-Kette, in der Histidin B 5 und Prolin B 28 durch Alanin ersetzt waren, in beiden Testsystemen gleiche biologische Wirkung wie das Bezugssystem (Kette 7).

Diese beiden Befunde warfen nun die Frage auf: Muß jeweils ein Histidin zur Aufrechterhaltung der Hormonaktivität vorhanden sein oder können beide gegen Alanin ausgetauscht werden?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine histidinfreie B-Kette synthetisiert (8) (beide Histidine und Threonin waren gegen Alanin ausgetauscht). Da sich der Threoninaustausch als stumme Substitution erwiesen hatte, könnte ein etwaiger Aktivitätsverlust nur dem Austausch der beiden Histidine zugeschrieben werden. Das mit dieser B-Kette gewonnene Hybrid-

insulin zeigte keine verminderte Aktivität.

Daß die Aktivitäten durch Verunreinigungen der zur Rekombination verwendeten A-Kette hervorgerufen wurden, kann völlig ausgeschlossen werden. Die A-Ketten wurden, bevor sie zur Rekombination mit synthetischen B-Ketten eingesetzt wurden, mit sich selbst unter denselben Bedingungen rekombiniert und ihre Aktivitäten gemessen. Erst solche Ketten, die unter o,ol % Wirkung zeigten, wurden verwendet.

Zur Sicherung dieses Ergebnisses wurde nochmals eine histidinfreie B-Kette synthetisiert (9). Neben den beiden Histidinen waren noch Threonin B 27 und Prolin B 28 durch Alanin ersetzt worden, ein Austausch der sich bereits als stumme Substitution erwiesen hatte. Die nach Kombination zum Hybridinsulin gefundene biologische Wirkung stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit dem oben erhaltenen Wert überein.

3.5.3. Des- Phe1 Val2 Asn 3 Gln4 His5 Ala28 B-Kette (1o)

Synthetische B-Kette, der das aminoendständige Pentapeptid fehlt, führte zum vollständigen Wirkungsverlust des Hybridinsulins (Kette 1o). Es ist kaum wahrscheinlich, daß diese Verkürzung der B-Kette die Kombination zum Hybridinsulin negativ beeinflußt. Auch ist in diesem Teilstück keine für die Wirkung notwendige Aminosäure zu suchen, denn B 5 und B 4 kann ausgetauscht und das aminoendständige Tripeptid B 1 bis B 3 kann ohne Aktivitätsverlust weggelassen werden

(W e b e r und W e i t z e l [51]). Vermutlich ist an gewissen Positionen nur die Anwesenheit einer beliebigen Aminosäure für die Hormonwirkung erforderlich, damit eine Mindestkettenlänge erhalten bleibt.

3.5.4. Austausch von Tyrosin B 16 gegen Alanin

In erster Linie deuten chemische Substitutionen der aromatisch gebundenen Hydroxylgruppen darauf hin, daß zumindest ein Teil von ihnen für die Hormonwirkung unerläßlich ist. Die Frage, welches der 4 Tyrosine des Insulins von Bedeutung ist, kann trotz deren unterschiedlicher Reaktivität aus Substitutionsexperimenten nicht sicher beantwortet werden.

Ein Hybridinsulin mit einer B-Kette (11), bei der Tyrosin B 16 und Threonin B 27 durch L-Alanin ersetzt wurde, war voll aktiv.

Bedingt durch die geringen Ausbeuten an Hybridinsulinen und der großen Schwankungsbreite des biologischen Tests kann nicht gesagt werden, ob ein Austausch zum Verlust von 2o oder 5o % der Wirkung führt. Es kann lediglich zwischen "wirkungslos" und "mit dem Bezugssystem vergleichbarer Aktivität" unterschieden werden.
Beim Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Hybridinsuline muß noch ein weiterer Faktor berücksichtigt werden:

Die Umsatzrate bei der Akondensation einer Aminosäure in der natürlichen Sequenz sei relativ niedrig. Der Austausch dieser Aminosäure gegen L-Alanin bringe eine Erhöhung des Umsatzes dieses Kupplungsschrittes (wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt) und führe somit zu einer Verbesserung der Endausbeute. Eine geringere spezifische Aktivität des abgewandelten Insulins würde so durch die bessere Ausbeute wettgemacht und nicht erkennbar werden.
Vor allem bei der histidinfreien Kette sollte dieser Möglichkeit Bedeutung zugemessen werden.

Abb. 2: Schema der synthetisierten B-Ketten

Tabelle 6: Biologische Aktivität der einzelnen Hybrid-insuline im Mäusefalltest

Kette	Aktivität in %	Zahl der Mäuse
1	0,5 ± 0,13	6o
2	0,7 ± 0,1	15o
3	1,o ± o,o7	6o
4+	0,7 ± o,o7	6o
5	o,4 ± o,1	6o
6	0,7 ± o,14	8o
7	0,5 ± o,17	11o
8+	0,5 ± o,1	6o
9	o,6 ± o,15	6o
1o+	0	5o
11	1,o ± o,1	8o

Für die Ausführung der Kombination der Ketten 1, 2, 6 und 7 möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. U. Weber herzlich danken.

Die mit +) bezeichneten Ketten wurden auch von Dr. U. Weber synthetisiert und vergleichbare Aktivitäten erhalten.

Tabelle 7:

Aminosäureanalysen der S-Sulfonat-B-Ketten

Kette	1		2		3		4		5		6	
AS	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Asp	1	0,67	1	0,69	1	0,93	1	0,69	1	0,73	1	0,86
Thr	1	1,12	1	0,89	-	-	-	-	1	1,04	1	0,92
Ser	1	0,70	1	1,05	1	0,86	1	0,80	1	0,66	1	0,78
Glu	3	2,73	3	3,00	3	3,21	3	3,00	3	2,89	3	3,03
Pro	1	1,27	-	-	1	0,67	-	-	1	0,98	-	-
Gly	3	2,91	3	3,16	3	3,40	3	3,29	3	3,11	3	2,97
Ala	2	2,24	3	3,16	3	2,80	4	4,74	3	3,33	4	4,10
Cys	2	+	2	+	2	+	2	+	2	1,85	2	1,91
Val	3	3,54	3	3,00	3	2,71	3	2,67	3	2,58	3	2,87
Leu	4	3,84	4	3,81	4	3,82	4	4,33	4	3,75	4	3,83
Tyr	2	2,12	2	1,95	2	2,17	2	1,37	2	2,32	2	1,71
Phe	3	3,24	3	2,31	3	3,00	3	2,81	3	2,98	3	2,68
Lys	1	1,00	1	0,97	1	0,61	1	1,15	-	-	1	1,03
His	2	1,51	2	1,48	2	1,30	2	1,35	2	1,24	1	0,78
Arg	1	0,97	1	1,05	1	1,08	1	1,01	1	1,32	1	1,07

Tabelle 7: Fortsetzung

Kette	7		8		9		10		11	
AS	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Asp	1	0,67	1	0,73	1	0,73	-	-	1	0,86
Thr	1	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	1	0,86	1	0,75	1	0,90	1	0,61	1	0,91
Glu	3	2,90	3	2,81	3	2,91	2	2,09	3	3,05
Pro	-	-	1	1,52	-	-	1	1,04	1	1,03
Gly	3	3,05	3	3,22	3	3,21	3	2,67	3	2,96
Ala	4	3,98	5	4,78	6	6,75	3	3,16	4	4,27
Cys	1	2,24	2	2,00	2	+	2	+	2	1,78
Val	3	2,74	3	2,54	3	2,54	2	2,09	3	2,52
Leu	4	3,98	4	3,84	4	4,02	4	3,76	4	3,88
Tyr	1	1,71	2	1,17	2	1,92	2	1,74	1	0,76
Phe	3	2,81	3	2,18	3	2,98	2	1,96	3	2,94
Lys	1	1,02	1	1,51	1	1,24	1	0,87	1	1,17
His	1	0,93	-	-	-	-	1	1,02	2	1,56
Arg	1	1,05	1	0,87	1	1,24	1	0,93	1	1,04

\+ = nicht bestimmt

3.6. Darstellung von natürlicher A- und B-Kette und Rekombination zu aktivem Hormon

Die Spaltung von Insulin in A- und B-Kette durch oxydative Sulfitolyse und Rekombination zu aktivem Hormon erfolgte nach einer Vorschrift von K a t s o y a n n i s et al. [141]. Insulin wurde in 8 M Guanidinhydrochlorid gelöst, Natriumtetrathionat und Natriumsulfit zugegeben und diese Lösung mit Ammoniak auf pH 8,9 - 9,2 gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden bei Zimmertemperatur war die Spaltung vollständig, A- und B-Kette waren quantitativ in die Buntesalze überführt. Trennung und Reinigung der beiden Ketten wurde chromatographisch an Dowex 5o (D i x o n und W a r d l a w [54]) oder an Aminoäthylcellulose (K a t s o y a n n i s et al. [141]) erreicht.

Zur Rekombination wurde die A-Kette (5 facher molarer Überschuß bezogen auf die B-Kette) mit Mercaptoäthanol reduziert und anschließend mit S-Sulfonat-B-Kette bei pH 9,6 und 2°C in Gegenwart von Luft zum Hormon kombiniert. Bei der Rekombination von natürlichen Ketten wurden 2o % Insulinaktivität, bezogen auf die Menge der eingesetzten B-Kette, erhalten.

Durch Rekombination von A-Kette mit sich selbst und Bestimmung der biologischen Aktivität konnten in einigen Fällen noch minimale Verunreinigungen mit natürlicher B-Kette nachgewiesen werden. Nur völlig reine, inaktive A-Ketten wurden zur Kombination mit den synthetischen B-Ketten verwendet.

4. Beschreibung der Versuche

4.1. Allgemeines

Schmelzpunkte:

Alle Schmelz- oder Zersetzungspunkte sind unkorrigiert und wurden mit dem Apparat nach Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, ermittelt.

Analysen:

Die Analysen wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität unter Leitung von Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff ausgeführt.
Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Methode von D u m a s.
Die Schwefelbestimmung erfolgte durch Veraschung nach S c h ö n i n g e r , die Sulfatbestimmung durch Leitfähigkeitsmessung nach P f u n d t .
Die optischen Aktivitäten wurden mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter LEP A 2 der Firma Carl Zeiss gemessen.
Die Aminosäureanalysen wurden in einem Unichrom Amino Acid Analyzer der Firma Beckman Instruments GmbH München durchgeführt. Die Peptide wurden 24 oder 36 Stunden mit 6 N HCl unter Stickstoff in zugeschmolzenen Reagenzgläsern bei 110°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in ein Kölbchen überführt und i.V. zur Trockene eingeengt.

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden Fertigfolien mit Fluorescenzzusatz MN-POLYGRAM der Firma Macherey-Nagel & Co. Düren, verwendet. Das Sorptions-

mittel war Kieselgel S-HR/UV_{254}.

Die Sichtbarmachung erfolgte mit Chlor-Tolidin-Reagenz.

4.1.1. Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe

L-Aminosäuren wurden von den Firmen Ajinomoto & Co., Merck und Serva bezogen.

DCCI: zur Synthese, Merck AG

Insulin: kristallines Rinderinsulin der Firma Hoechst, 27 I.E./mg Zinkgehalt ca. o,3 %.

2-Mercaptoäthanol: puriss. p.a. Fluka AG., Buchs, Schweiz

Sephadex: Sephadex-Gel, Pharmacia, Uppsala, Schweden

Triäthylamin: puriss. p.a. Fluka AG, Buchs, Schweiz

Dialysierschlauch: Visking-Dialyseschlauch 18/32 aus dem Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Alle Lösungsmittel waren absolut. Die Absolutierung erfolgte nach den üblichen in der Literatur beschriebenen Verfahren.

4.2. Präparativer Teil

4.2.1. Allgemeine Synthesen

N-Hydroxysuccinimid [142]

Zu einer Lösung von 112 g (1,6 Mol) Hydroxylaminhydrochlorid in 160 ml Wasser, 80 ml Dioxan und 320 ml 5 N NaOH wurden portionsweise unter Rühren 160 g (1,6 Mol) Bernsteinsäureanhydrid gegeben. Die Lösung verfärbte sich bräunlich-gelb. Durch Kühlung mit Eis wurde die Temperatur auf 20°C gehalten. Anschließend wurde 2 Stunden lang auf 60°C erwärmt und das Wasser-Dioxan-Gemisch i.V. abgedampft. Der Rückstand wurde im Ölbad auf 120°C erhitzt und 10 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Man legte nun vorsichtig ein Vakuum an und erhöhte die Temperatur langsam auf 160°C bis alles Wasser abdestilliert war. Nach Abkühlen auf 60°C wurde mit siedendem Essigester erschöpfend extrahiert. Die Essigesterextrakte wurden i.V. auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei sich beim Abkühlen das Produkt abschied. Dieses wurde abfiltriert und aus Essigester, unter Zusatz von Aktivkohle, umkristallisiert.

Fp.: 99-100°C

Ausbeute: 129 g = 70 % der Theorie

MG: 115,1

t-BOC-azid [143]

Eine Lösung aus 100 g (0,76 Mol) t-BOC-hydrazid in 80 ml Eisessig und 125 ml Wasser wurde auf 0°C gekühlt, unter kräftigem Rühren mit einer Lösung aus 57,4 g (0,83 Mol) $NaNO_2$ in 80 ml Wasser

versetzt. Das Gemisch verblieb noch 3o Min. im Eisbad, die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige 4mal mit je 4o ml Äther extrahiert. Organische Phase und Ätherextrakte wurden vereinigt, 3mal mit je 5o ml Wasser, 3mal mit je 4o ml 1 N $NaHCO_3$ Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Äther abdestilliert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

t-BOC-L-phenylalanin [126]

16,5 g (o,1 Mol) Phenylalanin wurden in 2o ml Wasser und 2o ml Dioxan suspendiert und nach Zugabe von 15,6 g (o,11 Mol) BOC-azid unter Rühren im Autotitrator bei pH 1o,1 mit 4 N NaOH titriert. Nach 14 Stunden wurde keine Lauge mehr aufgenommen und es resultierte eine klare gelbe Lösung. Nun wurde i.V. eingeengt, 2mal mit je 5o ml Essigester überschüssiges BOC-azid extrahiert auf 0°C gebracht und mit 4o %iger Citronensäurelösung angesäuert, dann 5mal mit je 5o ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte 5mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingeengt. Der verbleibende sirupöse Rückstand wurde aus Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 22,5 g = 85 % der Theorie

Fp.: 87-89°C Lit.Fp.: 84-86°C

Analyse: ber. für $C_{14}H_{19}NO_4$ MG: 265,3

ber.: 5,29 % N gef.: 5,33 %

$[\alpha]_{578}^{22} = -4,17$ (c = 1 Eisessig)

Lit.$[\alpha]_{578}^{18-25} = -4,o$ (c = 1 Eisessig)

t-BOC-O-benzyl-L-tyrosin [126]

Analog aus 27,6 g (o,1 Mol) O-Bzl-L-tyrosin bei pH 1o,4 mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-azid. Nach 9 Stunden mit 5o ml Essigester extrahiert, bei 0°C mit Eisessig angesäuert und 3mal mit je 3o ml Äther und einmal mit 3o ml Essigester extrahiert. Die Extrakte mit Wasser säurefrei gewaschen, getrocknet und i.V. eingeengt. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und durch Zugabe von Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 31,2 g = 83 % der Theorie

Fp.: 1o7-1o9°C Lit.Fp.: 1o9-11o°C

Analyse: ber. für $C_{21}H_{25}NO_5$ MG: 371,42

ber.: 3,76 % N gef.: 3,71 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = + 12,1 (c = 1 Aceton)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 12,1 (c = 1 Aceton)

O-Benzyl-L-tyrosin [127]

72,4 g (o,4 Mol) L-Tyrosin wurden in 2oo ml 2 N NaOH gelöst, eine wäßrige Lösung von 49,9 g (o,2 Mol) $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ zugegeben und am Wasserbad einige Zeit erwärmt. Beim Abkühlen scheidet sich der Kupferkomplex ab, durch Zugabe von 15oo ml Methanol und 2oo ml 2 N NaOH wurde dieser wieder in Lösung gebracht. Unlösliches wurde abfiltriert, 5o ml Benzylbromid auf einmal zugegeben und eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Ausgefallenes O-Bzl-L-tyrosin-kupfer wurde abfiltriert, mit Methanol/Wasser 1 : 3,5 gewaschen und bei 6o°C getrocknet. Zur Zerstörung des Kupferkomplexes wurde mehrmals mit 1 N HCl verrieben, abgesaugt,

mit Wasser verd. Ammoniak und Aceton sorgfältig gewaschen und aus 8o %iger Essigsäure umkristallisiert.

Ausbeute: 61 g = 55,5 % der Theorie

Fp.: 223°C Lit.Fp.: 223°C

Analyse: ber. für $C_{16}H_{17}NO_3$ MG: 271,23

ber.: 5,16 % N gef.: 5,11 % N

$[\alpha]_D$ = - 9,5 (c = 1 8o %ige Essigsäure)

Lit.$[\alpha]_D$ = - 9,9 (c = 1 8o %ige Essigsäure)

t-BOC-L-threonin-DCHA-Salz [126]

11,9 g (o,1 Mol) L-Threonin wurden analog mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 bei pH 9,5 3o Stunden titriert, mit Essigester extrahiert, bei 0° mit 4o %iger Citronensäure angesäuert, die Lösung mit NaCl gesättigt und 8mal mit je loo ml Essigester ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit ges. NaCl Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingeengt.

Das erhaltene Öl wurde in wenig Äther gelöst und mit einem geringen Überschuß Dicyclohexylamin versetzt. Nach kurzer Zeit fiel das DCHA-Salz aus. Dieses wurde aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 26 g = 65 % der Theorie

Fp.: 154°C Lit.Fp.: 152-153°C

Analyse: ber. für $C_{21}H_{41}N_2O_5$ MG: 4oo,43

ber.: 6,99 % N gef.: 7,o7 % N

$[\alpha]_{546}^{18-25}$ = 16,54 (c = 1,7 Äthanol)

Lit.$[\alpha]_{546}^{18-25}$ = 16,48 (c = 1,7 Äthanol)

t-BOC-L-valin [126]

Analog aus 23,5 g (o,2 Mol) L-Valin bei pH 9,5 und 31,2 g (o,22 Mol) t-BOC-N_3. 8 Stunden. Aufarbeitung wie oben beschrieben. Aus Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 35,7 g = 82 % der Theorie

Fp.: 73°C Lit.Fp.: 72-73°C

Analyse: ber. für $C_{1o}H_{2o}NO_4$ MG: 218,37

ber.: 6,45 % N gef.: 6,45 % N

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 5,77 (c = 1 Eisessig)

Lit.$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 6,o (c = 1 Eisessig)

t-BOC-L-leucin [126]

Aus 26,2 g (o,2 Mol) L-Leucin bei pH 9,75 mit 31,2 g (o,22 Mol) t-BOC-azid. 9 Stunden. Aufarbeitung wie bei Valin.

Ausbeute: 41 g = 89 % der Theorie

Fp.: 8o-82°C Lit.Fp.: 78-81°C

Analyse: ber. für $C_{11}H_{22}NO_4$ MG: 232,29

ber.: 6,14 % N gef.: 6,o7 % N

$[\alpha]_D^{18-25}$ = - 23,73 (c = 1 Eisessig)

Lit.$[\alpha]_D^{18-25}$ = - 24 (c = 1 Eisessig)

t-BOC-L-tyrosin-p-nitrophenylester [134]

Zu einer Lösung von 2 g (5,4 mMol) und o,83 g (6 mMol) in 5 ml abs. Tetrahydrofuran wurden bei 0°C 1,1 g (5,4 mMol) DCCI zugegeben. Nach je 24 Stunden bei 0°C und bei Zimmertemperatur

wurde Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit THF nachgewaschen und das Lösungsmittel i.V. entfernt. Der Rückstand wurde aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,4 g = 93 % der Theorie

Fp.: 142-144°C Lit.Fp.: 145-146°C

Analyse: ber. für $C_{27}H_{28}N_2O_7$ MG: 492,5

ber.: 5,69 % N gef.: 5,51 % N

$[\alpha]_D^{22} = -2,2$ (c = 1 DMF)

Lit. $[\alpha]_D^{22} = -3,02$ (c = 1 DMF)

N^{ε}-Cbo-L-lysin [128]

12 g (6,7 mMol) Lysinhydrochlorid wurden in 750 ml Wasser gelöst, 20 g (16 mMol) $CuCO_3$ zugesetzt und 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Die heiße Lösung wurde filtriert, 21 g $NaHCO_3$ zugegeben und innerhalb einer halben Stunde 12 g (7,3 mMol) Cbo-chlorid unter Rühren und Eiskühlung zugetropft. Es wurde noch eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt, der ausgeschiedene Kupferkomplex abfiltriert, mit Wasser und Aceton gewaschen und i.V. getrocknet. Dieser wurde in 250 ml Wasser suspendiert, zum Sieden erhitzt, 30 Min. H_2S eingeleitet mit 8 ml 5 N HCl angesäuert, Aktivkohle zugegeben und heiß filtriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate mit 4 N NaOH auf pH 7 gebracht. Beim Erkalten fiel N^{ε}-Cbo-L-lysin aus. Aus 50 %igem Äthanol wurde umkristallisiert.

Ausbeute: 14,5 g = 77 % der Theorie

Fp.: 245°C Lit.Fp.: 250°C

Analyse: ber. für $C_{14}H_{2o}N_2O_4$ MG: 28o,32

ber.: lo,o % N gef.: lo,2 % N

$[\alpha]_D^{26}$ = + 15,6 (c = 1 2 N HCl)

Lit. $[\alpha]_D^{25}$ = + 14,o (c = 1,6 2 N HCl)

N$^{\alpha}$-t-BOC-N$^{\varepsilon}$-Cbo-L-lysin-DCHA-Salz [126]

Aus 14 g (o,o5 Mol) ε-Cbo-L-lysin bei pH lo,2 mit 7,8 g (o,o5 Mol) t-BOC-N_3 9 Stunden gerührt und wie oben aufgearbeitet. Das erhaltene Öl wurde in wenig Essigester gelöst mit 9 g (o,o55 Mol) Dicyclohexylamin bei 0°C versetzt, bis zur Trübung Petroläther zugegeben und bei Zimmertemperatur kristallisiert.

Ausbeute: 24 g = 85 % der Theorie

Fp.: llo-lll°C Lit.Fp.: llo-lll°C

Analyse: ber. für $C_{31}H_{51}N_3O_6$ MG: 561,43

ber.: 7,48 % N gef.: 7,73 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 5,o (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,3 (c = 1 Eisessig)

N$^{\alpha}$-Cbo-L-arginin [132,144]

Eine Lösung von 26,5 g (o,55 Mol) L-Arginin in 15o ml Wasser wurde mit 5o ml Äther überschichtet und unter Eiskühlung mit

26,5 g (o,16 Mol) Cbo-Cl und 75 ml 2 N NaOH versetzt. Gegen Ende der Reaktion begann das Produkt auszufallen. Es wurde aus heißem Wasser, dem einige Tropfen NH_4OH zugesetzt waren, umkristallisiert.

Ausbeute: 27,5 g = 48 % der Theorie

Fp.: 175°C Lit.Fp.: 175°C

Analyse: ber. für $C_{14}H_{2o}N_4O_4$ MG: 3o8,32

ber.: 18,2 % N gef.: 18,64 % N

N$^{\alpha}$-Cbo-N^{G}-tosyl-L-arginin [133]

25 g (81 mMol) wurden in einer Mischung von 1oo ml Wasser und 4oo ml Aceton suspendiert, auf 0°C gekühlt und kräftig gerührt. Mit 4 N NaOH (vorgekühlt) wird auf pH 11 - 11,5 gebracht. Nach 1,5 bis 2 Stunden war alles gelöst. Dazu wurden über 3o Min. 38 g (2oo mMol) p-Toluolsulfonsäurechlorid, gelöst in 6o ml Aceton, tropfenweise zugegeben. Es wurde noch 3 Stunden bei 0°C und pH 11 - 11,5 weitergerührt, mit 1 N HCl auf pH 7 gebracht und Aceton i.V. abgedampft. Der Rückstand in 2oo ml Wasser aufgenommen, 3mal mit je 15o ml Äther extrahiert, die wäßrige Phase auf 0°C abgekühlt, mit 6 N HCl auf pH 3 angesäuert, wobei sich ein Öl abschied. Die wäßrige Phase wurde abgetrennt, mit NaCl gesättigt und mit Essigester extrahiert (3mal je 15o ml). Das Öl wurde in den Essigesterextrakten gelöst, mit o,1 N HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingeengt. Es wurde aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 22 g = 59 % der Theorie

Fp.: 86°C Lit.Fp.: 86-89°C

Analyse: ber. für $C_{21}H_{26}N_4O_6S$ MG: 462,5

ber.: 12,1 % N gef.: 13,o % N
6,93 % S 6,3 % S

N^G-Tosyl-L-arginin[133,145)]

5o g N$^\alpha$-Cbo-N^G-tosyl-L-arginin wurden in 44o ml Methanol/Eisessig/Wasser 7:3:1 gelöst, mit 5 g Palladium/Kohle Katalysator versetzt und hydriert. 6mal mußte der Katalysator gewechselt werden, da er bald vergiftet war.
War die berechnete Menge H_2 aufgenommen worden, wurde der Katalysator abfiltriert, das Filtrat i.V. eingedampft und der Rückstand aus Wasser kristallisiert.

Ausbeute: 28,2 g = 79 % der Theorie

Fp.: 143-145°C Lit.Fp.: 146-15o°C

Analyse: ber. für $C_{13}H_{2o}N_4O_4S$ MG: 328,4

ber.: 17,1 % N gef.: 16,5 % N
9,77 % S 9,6 % S

$[\alpha]_D^{22} = -6,3$ (c = 1 Methanol)

Lit.$[\alpha]_D^{23} = -6,1$ (c = 1 Methanol)

N$^\alpha$-t-BOC-N^G-tosyl-L-arginin [126)]

34,8 g (o,1 Mol) N^G-Tosyl-L-arginin wurden in 5o ml H_2O + 5o ml Dioxan suspendiert, mit 4o g (o,28 Mol) t-BOC-N_3 versetzt und 72 Stunden bei pH 9,8 titriert, mit Wasser verdünnt,

2mal mit je 5o ml Äther ausgeschüttelt und auf 0°C gekühlt. Das mit Citronensäure angesäuerte Reaktionsprodukt wurde mehrmals mit Essigester extrahiert, die Extrakte mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingeengt. Der ölige Rückstand wurde aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 4o,5 g = 89 % der Theorie

Fp.: 95°C Lit.Fp.: 98-1oo°C

Analyse: ber. für $C_{18}H_{28}N_4O_6S$ MG: 428,5

ber.: 13,1 % N gef.: 12,2 % N
7,48 % S 7,2 % S

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 3,2 (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 3,2 (c = 1 Eisessig)

t-BOC-alanin [126]

Analog aus 8,9 g (o,1 Mol) L-Alanin bei pH 1o,1 mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 8 Stunden. Kristallisiert aus Äther/Petroläther.

Ausbeute: 16,8 g = 92 % der Theorie

Fp.: 8o-81°C Lit.Fp.: 8o-81°C

Analyse: ber. für $C_8H_{15}NO_4$ MG: 189,2

ber.: 7,4 % N gef.: 7,2 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 25,9 (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 25,2 (c = 1 Eisessig)

t-BOC-glycin[126)]

Aus 7,5 g (o,1 Mol) Glycin bei pH 1o,o mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 3 Stunden.

Ausbeute: 16 g = 91 % der Theorie

Fp.: 93°C Lit.Fp.: 94°C

Analyse: ber. für $C_7H_{13}NO_4$ MG: 175,1

ber.: 8,o % N gef.: 7,92 % N

t-BOC-L-prolin [126)]

Aus 11,5 g (o,1 Mol) L-Prolin bei pH 8,6 mit 15,6 g (o,11 Mol) BOC-azid 1 Stunde titriert. Aufgearbeitet wie oben. Aus Essigester/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 17,5 g = 81 % der Theorie

Fp.: 137-138°C Lit.Fp.: 134-136°C

Analyse: ber. für $C_{1o}H_{17}NO_4$ MG: 215,2

ber.: 6,5 % N gef.: 6,44 % N

$[\alpha]_D^{22}$ = - 59,o (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_D^{22}$ = - 6o,o (c = 1 Eisessig)

N^{im}-Bzl-L-histidin [129)]

2o g (81 mMol) wurden in 2oo ml flüssigem NH_3 in einen 5oo ml Dreihalskolben, der mit einem Rührer versehen war, gegeben. Dazu gab man 7,5 g (o,324 Mol) Natrium. War die Blaufärbung verschwunden, wurden 14,7 g (83 mMol) Benzylchlorid eingetropft, noch 2o Min. gerührt und der Ammoniak

abgedampft. Der Rückstand wurde in 1oo ml Eiswasser gelöst, mit Äther extrahiert, filtriert und mit verd. H_2SO_4 auf pH 8 gebracht, wobei das Produkt zu kristallisieren begann. Aus 7o %igem Äthanol wurde umkristallisiert.

Ausbeute: 13 g = 65 % der Theorie

Fp.: 248-249°C Lit.Fp.: 248-249°C

Analyse: ber. für $C_{13}H_{15}N_3O_2$ MG: 245,3

ber.: 17,o % N gef.: 16,75 % N

N^{α}-t-BOC-N^{im}-Bzl-L-histidin [126]

12,3 g (5o mMol) wurden in 1o ml Dioxan/ 1o ml Wasser nach Zugabe von 7,8 g (55 mMol) BOC-azid bei pH 9,8 umgesetzt. Dabei schied sich aus der Suspension das Natriumsalz des BOC-Derivates kristallin ab. Nach 26 Stunden wurde abgesaugt, in Wasser aufgeschlämmt, mit Eisessig auf pH 5,4 gebracht und 2o Min. gerührt. Das freie BOC-Derivat wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und i.V. getrocknet. Aus Pyridin/ Essigester wurde umkristallisiert.

Ausbeute: 5 g = 55 % der Theorie

Fp.: 181-183°C Lit.Fp.: 181-183°C

Analyse: ber. für $C_{18}H_{23}N_3O_4$ MG: 345,3

ber.: 12,17 % N gef.: 12,43 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = + o,4 (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + o,5 (c = 1 Eisessig)

S-Bzl-L-cystein [130]

12,1 g (0,1 Mol) L-Cystein wurden in einer Mischung aus 40 ml 2 N NaOH und 75 ml Äthanol gelöst. Unter Rühren tropfte man 13,9 ml (0,11 Mol) Benzylbromid zu. Nach einiger Zeit fiel S-Bzl-L-cystein aus, man rührte noch eine Stunde und stellte kalt. Kristallisierte aus Wasser.

Ausbeute: 16 g = 75 % der Theorie

Fp.: 222-226°C Lit.Fp.: 222-226°C

Analyse: ber. für $C_{10}H_{13}NO_2S$ MG: 211,1

ber.: 6,64 % N	gef.: 6,58 % N
15,1 % S	15,2 % S

t-BOC-S-bzl-L-cystein [126]

10,5 g (50 mMol) S-Bzl-L-cystein bei pH 9,6 mit 7,8 g (55 mMol) t-BOC-N_3 14 Stunden umgesetzt. Wie üblich aufgearbeitet. Aus Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 14,3 g = 92 % der Theorie

Fp.: 83-84°C Lit.Fp.: 63-65°C

Analyse: ber. für $C_{15}H_{21}NO_4S$ MG: 311,2

ber.: 4,59 % N	gef.: 4,65 % N
10,3 % S	10,47 % S

$[\alpha]_{578}^{22} = -44,8$ (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25} = -45,3$ (c = 1 Eisessig)

t-BOC-L-asparagin [126]

13,2 g (o,1 Mol) L-Asparagin bei pH 9,5 mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 4o Stunden titriert. Analog aufgearbeitet. Aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 15,8 g = 68 % der Theorie

Fp.: 174-176°C Lit.Fp.: 174-176°C

Analyse: ber. für $C_9H_{16}N_2O_5$ MG: 232,2

ber.: 12,o5 % N gef.: 11,93 % N

$[\alpha]_{578}^{22} = -8,1$ (c = 1 DMF)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25} = -8,5$ (c = 1 DMF)

t-BOC-L-asparagin-p-nitrophenylester [135]

15,8 g (68 mMol) t-BOC-L-asparagin wurden in 218 ml THF und 65 ml DMF gelöst, mit 1o,5 g (75 mMol) p-Nitrophenol versetzt, auf 0°C gekühlt und 14,1 g (68 mMol) DCCI zugegeben. 6 Stunden wurde bei 0°C gerührt, dann Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat i.V. eingeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit verd. $NaHCO_3$-Lösung, 1o %iger Citronensäure und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand aus abs. Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 11,2 g = 47 % der Theorie

Fp.: 147-149°C Lit.Fp.: 148-149°C

Analyse: ber. für $C_{15}H_{19}N_3O_7$ MG: 353,2

ber.: 11,9 % N gef.: 11,52 % N

$[\alpha]_D^{22} = -43,o$ (c = 1 DMF)

Lit. $[\alpha]_D^{26} = -45,3$ (c = 1 DMF)

t-BOC-L-glutamin [126]

14,6 g (o,1 Mol) L-Glutamin bei pH 1o,3 mit 15,8 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 3o Stunden titriert. Wie vorher beschrieben aufgearbeitet. Aus Essigester umkristallisiert.

Ausbeute: 16 g = 65 % der Theorie

Fp.: 116-118°C Lit.Fp.: 114-118°C

Analyse: ber. für $C_{1o}H_{18}N_2O_5$ MG: 246,1

ber.: 11,38 % N gef.: 11,5 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 3,o (c = 1 Äthanol)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 2,9 (c = 1 Äthanol)

t-BOC-L-glutamin-p-nitrophenylester [134]

Eine Lösung von 19,8 g (8o mMol) t-BOC-L-glutamin und 12,2 g (88 mMol) p-Nitrophenol in 5o ml DMF wurde bei 0°C mit 16,4 g (8o mMol) DCCI versetzt und je 24 Stunden bei 0°C und Zimmertemperatur stehen gelassen. DCH abgesaugt mit DMF gewaschen und i.V. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 8,8 g = 3o % der Theorie

Fp.: 149-15o°C Lit.Fp.: 14o-146°C

Analyse: ber. für $C_{16}H_{21}N_3O_7$ MG: 367,2

ber.: 11,43 % N gef.: 11,39 % N

$[\alpha]_D^{22}$ = - 31,5 (c = 1 Essigester)

Lit. $[\alpha]_D^{22}$ = - 31 (c = 1 Essigester)

L-Glutaminsäure-γ-benzylester [144]

500 ml Äther wurden unter Rühren und Eiskühlung mit 50 ml 98 %iger H_2SO_4 versetzt, 500 ml frisch destillierter Benzylalkohol zugetropft und der Äther i.V. abgezogen. Zum Rückstand wurden 73,5 g (0,5 Mol) L-Glutaminsäure portionsweise zugegeben und die klare Lösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurden 1000 ml Äthanol und 250 ml Pyridin unter starkem Rühren zugesetzt, wobei ein weißer Niederschlag ausfällt. 10 Stunden wurde im Eisbad weiter gerührt, abgesaugt, mit abs. Äther gewaschen und aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 80 g = 68 % der Theorie

Fp.: 172-174°C Lit.Fp.: 172-174°C

Analyse: ber. für $C_{12}H_{15}NO_4$ MG: 237,1

ber.: 6,18 % N gef.: 6,22 % N

t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzylester [126]

Aus 23,75 g (0,1 Mol) L-Glutaminsäure-γ-benzylester bei pH 9,3 mit 15,6 g (0,11 Mol) t-BOC-N_3 22 Stunden umgesetzt und wie üblich aufgearbeitet.

Ausbeute: 13,5 g = 40 % der Theorie

Fp.: 52,5 - 56°C

Analyse: ber. für $C_{17}H_{23}NO_6$ MG: 337,2

ber. 4,15 % N gef.: 4,10 % N

$[\alpha]_{578}^{22} = -8,9$ (c = 1 Methanol)

t-BOC-O-benzyl-L-serin [126]

Aus 18,3 g (o,1 Mol) O-Benzyl-L-serin mit 15,6 g (o,11 Mol) t-BOC-N_3 bei pH 9,5 8 Stunden titriert und analog oben aufgearbeitet.

Ausbeute: 21,8 g = 6o % der Theorie

Fp.: 57-6o°C

Analyse: ber. für $C_{14}H_{21}NO_5$ MG: 263,2

ber.: 5,33 % N gef.: 5,31 % N

$[\alpha]_{578}^{22}$ = + 35,o (c = 1 THF)

4.2.2. Synthese der Decapeptide

Für alle Versuche wurde ein Copolymerisat aus Styrol 1 % / Divinylbenzol verwendet. Das Harz wurde sukzessive mit 1 N NaOH, 1 N HCl, Wasser, DMF und Methanol gewaschen und bei 1oo°C i.V. getrocknet.

Chlormethylpolymer+)

Zur Chlormethylierung wurde Merrifield's Methode verwendet [61], Etwas größere Mengen von $SnCl_4$ wurden verwendet. Der Chlorgehalt des Harzes betrug 7,48 % = 2,2 mMol Cl/g Harz.

BOC-Ala-Harz

2o g Harz wurden in einer Lösung von 14 g (44,4 mMol) BOC-L-Alanin in 1oo ml abs. Äthanol + 5,6 ml (4o mMol) Triäthylamin suspendiert und 48 Stunden bei 8o°C gerührt. Dann wurde das Harz abfiltriert, mehrmals mit Äthanol, Wasser und Methanol gewaschen und i.V. getrocknet.

Bestimmung des Alaningehaltes

Zur Bestimmung des Alaningehaltes wurde eine bestimmte Menge BOC-Ala-Polymer mit 6 N HCl 24 Stunden in einem verschlossenen Reagenzglas bei 11o°C hydrolysiert. Das im Vakuum getrocknete Hydrolysat wurde in einem automatischem Aminosäureanalysator analysiert.

Gefunden wurden: o,8 mMol Alanin/g Harz.

+) Für die großzügige Überlassung von chlormethyliertem Harz möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. S. Hörnle herzlich danken.

Aufbau des Decapeptides am Harz

Begonnen wurde mit 1 g Harz (o,8 mMol BOC-Alanin). Um eine Aminosäure anzukuppeln, waren folgende Reaktionsschritte notwendig: 1. Entfernung der Schutzgruppe mit 15 ml 1 N HCl in Eisessig 3o Minuten, je 3mal 3 Minuten waschen mit 2o ml Eisessig, Äthanol und DMF. 2. Freisetzen der Aminogruppe mit 1,5 ml Triäthylamin in 15 ml DMF 1o Minuten, 3mal 3 Min. waschen mit 2o ml DMF (oder wurde CH_2Cl_2 als Lösungsmittel für die Kupplung verwendet, je 3mal 3 Minuten waschen mit DMF und CH_2Cl_2). 3. Zur Kupplung wurde mit 2,88 mMol (3,6-facher Überschuß) der jeweiligen BOC-Aminosäure in 1o ml DMF oder CH_2Cl_2 1o Minuten geschüttelt, 1 ml einer 2,88 molaren DCCI Lösung zugegeben und 2 Stunden geschüttelt. Wurden die p-Nitrophenylester der BOC-Aminosäuren zur Ankondensation verwendet, wurden diese in DMF 22 Stunden mit dem Peptidharz umgesetzt. Dann wurde je 3mal 3 Minuten mit 3o ml DMF oder CH_2Cl_2, Äthanol und Eisessig gewaschen.

Abspaltung vom Harz

Nachdem die letzte Aminosäure ankondensiert war, wurde das BOC-Peptid-Polymer mit Äthanol gewaschen, i.V. getrocknet, in 15 ml Trifluoressigsäure suspendiert und 6o Minuten HBr durchgeleitet. Vom Harz wurde abgesaugt, 2mal mit Trifluoressigsäure gewaschen und die vereinigten Filtrate i.V. eingeengt. Der ölige Rückstand wurde in Trifluoressigsäure aufgenommen und durch Eingießen in Äther ausgefällt. Es

wurde noch 3mal mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 870 mg = 82 % der Theorie

Das Tosyldecapeptidhydrobromid kristallisierte aus Äthanol.

$[\alpha]_{578}^{23} = -22{,}5^{\circ} \pm 1^{\circ}$

Aminosäureanalyse:

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
theoret.	1	1	1	1	1	2	1	1	1
gef.:	1,00	0,99	0,94	1,03	0,78	2,07	1,06	0,98	1,02

Synthese des Decapeptides mit N-Hydroxysuccinimid/DCCI

Bei der Ankondensation der Aminosäuren wurde pro Mol anzukuppelnde Aminosäure 2 Mole N-Hydroxysuccinimid zugegeben. Reaktionszyklus und Aufarbeitung war dieselbe wie vorher beschrieben wurden.

Ausbeute: 600 mg = 58 % der Theorie

Aminosäureanalyse:

	Ala	Lys	Pro	Thre	Tyr	Phe	Gly	Arg	Glu
theoret.	1	1	1	1	1	2	1	1	1
gef.:	1,0	0,93	0,68	0,34	0,17	0,28	0,12	0,07	0,05

4.2.3. Synthese der Rinder B-Kette und deren Analoga

Die B-Kette wurde ausgehend von 0,4 mMol BOC-Alanin-Harz (0,5 g) wie die Decapeptide am Polymer aufgebaut. Nach 29 Reaktionszyklen wurde das Triacontapeptid vom Harz mit Tri-

fluoressigsäure/HBr abgespalten. Dabei wurden gleichzeitig die Schutzgruppen von Tyrosin, Glutaminsäure und Lysin entfernt. Durch Eingießen einer Trifluoressigsäure-Lösung des teilweise geschützten Triacontapeptides in Äther wurde es ausgefällt. Nun wurde noch 3mal mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 650-780 mg = 45-54 % der Theorie

Abspaltung der restlichen Schutzgruppen und Sulfitolyse

300 mg N^{G}-Tosyl-S,S',N^{im},$N^{im'}$-tetrabenzyl-B-Kette wurden in über Natrium destilliertem Ammoniak gelöst und soviel einer gekühlten Lösung von Natrium in flüssigem Ammoniak zugegeben, bis die blaue Farbe für 15 bis 20 Sekunden bestehen blieb. Es wurde dann abgedampft und restliches NH_3 i.V. entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und soviel 1 N Essigsäure zugegeben, bis gerade ein Niederschlag ausfällt. Mit 1 N NH_4OH wurde auf pH 9 - 9,5 gebracht, wobei alles in Lösung geht. Dieser Lösung wurden 250 mg Tetrathionat, 500 mg Natriumsulfit und etwas Trispuffer zugegeben, der pH wurde auf 9 eingestellt und 3 Stunden bei 37°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in einen 18/32 Visking Dialyseschlauch gegeben und über Nacht bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert. Während der Dialyse bildete sich ein weißer Niederschlag. Das Dialysat wurde in ein Zentrifugenglas gegossen, mit NH_4OH der pH auf 9,5 gebracht und von etwas Unlöslichem abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 N Essigsäure auf

pH 5 angesäuert und 2 Stunden auf Eis gestellt, wobei die B-S-Sulfonat-Kette ausfällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit wenig Wasser gewaschen, mit einigen Tropfen NH_4OH in Lösung gebracht, mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

Ausbeute: 137 mg = 5o % der Theorie

Reinigung über Sephadex G 5o

Sephadex G 5o wird über Nacht in Wasser quellen gelassen, Wasser abfiltriert und in o,ol N NH_4HCO_3 Puffer pH 9 suspendiert. Das Gel läßt man absitzen, kleine Teilchen wurden durch Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit entfernt. Dieser Vorgang wurde 3mal wiederholt, dann wurde i.V. entgast und die Säule gefüllt.

5o mg B-S-Sulfonat-Kette wurden in 1 ml Puffer gelöst auf pH 9 gebracht, aufgetragen und mit 1 ml Puffer nachgewaschen. Das Eluationsdiagramm wurde mit einem LKB Uvicord bei 256 nm aufgenommen und die einzelnen Fraktionen mit einem LKB Fraktionssammler gesammelt. Die Fraktionen, die die B-S-Sulfonat-Kette enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 25 mg = 5o % der Theorie.

4.2.3.1. Kombination von synthetischer B-Kette mit natürlicher A-Kette[146)]

2o mg $A(SSO_3^-)_4$ wurden in 5 ml O_2freiem Wasser (kochen über N_2) gelöst und mit 1 N Essigsäure auf pH 5 gebracht. Zu dieser Lösung gab man o,8 ml 1 M Mercaptoäthanol und stellte sie 6 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Mit Eis wurde danach

auf ca. 15°C gekühlt. In einer Kutscher-Steudel-Apparatur wurde 2 Stunden mit Essigester extrahiert, die Essigesterphase abgetrennt und restlicher Essigester dadurch entfernt, daß N_2 durchgeleitet wurde. Alle Reaktionsschritte wurden unter N_2 ausgeführt. Das erhaltene schleimige Produkt wurde mit 5 mg synthetischer S-Sulfonat-B-Kette und 5 ml Wasser gemischt. Mit 1 N NaOH wurde ein pH-Wert von 9,6 eingestellt, wobei eine klare Lösung erhalten wurde. Zu dieser Lösung wurden o,8 ml o,1 M Glycinpuffer vom pH 9,6 gegeben und bei 2°C in Kontakt mit Luft 18-22 Stunden stehen gelassen. Danach wurde mit 1 N Essigsäure auf pH 7,4 gebracht, in Puffer aufgenommen und im Mäusefalltest die biologische Aktivität gemessen.

4.3. Messung der biologischen Aktivität

Der von Y o u n g und L e w i s [147] beschriebene Mäusefalltest wurde in etwas abgewandelter Form zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. Die Tiere wurden 3o Stunden vor Testbeginn nüchtern gesetzt; der Test wurde bei 3o°C ausgeführt.
Den Mäusen wurden je nach Aktivität o,1 bis o,3 ml der Kombinationslösung i.p. injiziert.
Für jeden Wert wurde eine Gruppe von 1o Mäusen benutzt, die nach der Injektion in schräg stehende langsam rotierende Maschendrahtzylinder gesetzt wurden. Infolge der blutzuckersenkenden Wirkung beginnen die Mäuse zu krampfen und fallen aus dem Zylinder. Mäuse, die während der ersten 8 Minuten

nach der Injektion heruntergefallen waren, wurden wieder eingesetzt.

Zur Errechnung der Insulinwirkung wurde eine Eichkurve aufgenommen: Die Zahl der gefallenen Mäuse pro Gruppe wurde gegen die Insulinkonzentration in einem Diagramm aufgetragen und daraus die Aktivität der Kombinationslösung abgelesen. Als Bezugspunkt wurde diejenige Insulinmenge gewählt, die theoretisch aus der Menge der eingesetzten B-Kette entstehen konnte. Die Aktivitäten der einzelnen Ketten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

5. Zusammenfassung

Die Darstellung von Decapeptiden der C-terminalen Sequenz der Rinderinsulin-B-Kette, von Rinder-B-Kette und von B-Ketten variierter Sequenz mit der Methode der Peptidsynthese am festen Träger nach M e r r i f i e l d wird beschrieben.

Wesentlich bessere Umsatzraten als in Dimethylformamid werden in Methylenchlorid als Kupplungsmedium erzielt. Kombination von Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid zur Ankondensation der t-Butyloxycarbonyl-Aminosäuren führt schon nach wenigen Kupplungsschritten zu einem sprunghaften Abfall der Umsatzraten.

Austausch schlecht ankondensierbarer Aminosäuren gegen Alanin zeigte, daß sowohl die Amin- als auch die Carboxylkomponente den Grad der Umsetzung beeinflussen.

Nach Austausch von Prolin und Threonin gegen Alanin und mehrmaligem Kuppeln mit Tyrosin wurde einheitliches Decapeptid in guten Ausbeuten erhalten.

Zehn Varianten der B-Kette des Rinderinsulins wurden dargestellt. Nach Kombination mit natürlicher Rinder-A-Kette waren biologisch wirksam: Ala28 B-Kette, Ala 27 B-Kette, Ala27-Ala28-B-Kette, Ala5-Ala28 B-Kette, Ala10-Ala 28 B-Kette, Ala5-Ala10-Ala27 B-Kette, Ala29 B-Kette, Ala5-Ala10-Ala27-Ala28 B-Kette und Ala16-Ala27 B-Kette. Unwirksam waren Des-Phe1 desVal2 desAsn3 desGln4 desHis5 B-Kette.

6. Schrifttum

1. Banting F.G. und C.H. Best
   J.Lab.clin.Med. 7 251 (1922)

2. Brown H., E. Sanger und R. Kitai
   Biochem.J. 6o 556 (1955)

3. Freudenberg K. und W. Dirschel
   Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 157 64 (1926)

4. Freudenberg K., W. Dirschel und H. Eyer
   Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 2o2 128 (1931)

5. Du Vigneaud V., A. Fitsch, E. Pekarek und W.W. Lackwood
   J.biol.Chem. 94 233 (1931)

6. Wintersteiner O.
   J.biol.Chem. 1o2 479 (1933)

7. Stern K.G. und A. White
   J.biol.Chem. 117 95 (1937)

8. Fraenkel-Conrat J. und H. Fraenkel-Conrat
   Biochim.biophysica Acta 5 89 (195o)

9. Glendening M.B., D.M. Greenberg und H. Fraenkel-Conrat
   J.biol.Chem. 167 125 (1947)

1o. Nicol D.S.H.
   Biochim.biophysica Acta 34 257 (1959)

11. Carr F.H., K. Culhane, A.T. Fuller und S.W. Underhill
   Biochem. J. 23 1o1o (1929)

12. Chrambach A. und F.H. Carpenter
   J.biol.Chem. 235 3478 (196o)

13. Reitz, H.C, R.E. Ferrel, H. Fraenkel-Conrat und F.C. Olcott und H.S. Olcott
   J. Amer. chem. Soc. 68 1o24 (1946)

14. Bischoff F. und M. Sahyun
J. biol. Chem. 81 167 (1929)

15. Folin O. und H. Malmros
J. biol. Chem. 83 115 (1929)

16. Freudenberg K. und W. Dirschel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 175 (1928) .

17. Freudenberg K. und H. Eyer
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 213 226 (1932)

18. Stern K.G. und A. White
J. biol. Chem. 122 371 (1938)

19. Harington C.R. und A. Neuberger
Biochem. J. 3o 8o9 (1936)

2o. Springell P.H.
Biochim. biophysica Acta 63 (1962)

21. Garrat L.J.
a Nature (London) 2o1 1324 (1964)

22. Lee N.D.
Federat. Proc. 18 271 (1959)

23. Izzo J.L., A. Roncone, M.J. Izzo und W.F. Bale
J. biol. Chem. 239 3749 (1964)

24. Sluyterman L.A.A. und J.M. Kwestroo-van-den-Bosch
Biochim. biophysica Acta 38 1o2 (196o)

25. Jensen H., E.A. Evans, W.D. Pennington und E.D. Schock
J. biol. Chem. 114 199 (1936)

26. Hopkins S.I. und A. Wormall
Biochem. J. 28 2125 (1934)

27. Jensen H. und E.A. Evans
J. biol. Chem. 1o8 1 (1935)

28. Olcott H.S. und H. Fraenkel-Conrat
Chem. Reviews 41 151 (1947)

29. Miller G.L. und M.W. Stanley
J. biol. Chem. 141 9o5 (1941)

3o. Tietze F., G.E. Mortimore und N.R. Lomax
Biochim. biophysica Acta 59 336 (1962)

31. Bromer W.W., S.K. Sheehan, A.W. Berns und E.R. Arquilla
Biochemistry 6 2378 (1967)

32. Mills G.L.
Biochem. J. 53 37 (1953)

33. Levy D. und F.H. Carpenter
Biochemistry 6 3559 (1967)

34. Evans R.L. und N.A. Saroff
J. biol. Chem. 228 295 (1957)

35. Li C.H.
Nature (London) 178 14o2 (1956)

36. Weitzel G., W. Schaeg, G. Boden und B. Willms
Liebigs Ann Chem. 689 248 (1965)

37. Weil L., T.S. Seibles und T.T. Herskovits
Arch. Biochem. Biophysics 111 3o8 (1965)

38. Bosshard H.R. und R.E. Humbel
5th Meeting of the Federation of European Biochem. Soc.
Prag 15 - 2o.7.1968

Bosshard H.R., K.H. Jørgensen und R.E. Humbel
European J. Biochem. 9 353 (1969)

39. Harris J.I. und C.H. Li
J. Amer. chem. Soc. 74 2945 (1952)

4o. Slobin L.I. und F.H. Carpenter
Biochemistry 2 16 (1963)

41. Nicol D.S.H.
Biochem. J. 75 395 (196o)

42. Slobin L.I. und F.H. Carpenter
Biochemistry 2 22 (1963)

43. Carpenter F.H. und W.H. Baum
J. biol. Chem. 237 4o9 (1962)

44. Young J.D. und F.H. Carpenter
J. biol. Chem. 236 743 (1961)

45. Smith E.L., R.L. Hill und A. Borman
Biochim. biophysica Acta 29 2o7 (1958)

46. Prout Th.
Metoblism. clin and exp. 12 679 (1963)
(CA. 6o 2oo4 (1964))

47. Jost K., J. Rundinger, H. Klostermeyer und H. Zahn
Z. Naturforsch. 23b 1o59 (1968)

48. Weber U., S. Hörnle, P. Köhler, G. Nagelschneider, K. Eisele und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349 512 (1968)

49. Hörnle, S., U. Weber und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349 1428 (1968)

5o. Weber U., F. Schneider, P. Köhler und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348 947 (1967)

51. Weber U. und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349 1431 (1968)

52. Weber U., S. Hörnle, G. Grieser, K.-H. Herzog und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348 1715 (1968)

53. Brandenburg D. und H.A. Ooms
Protein and Polypeptide Hormones
Pro. of the Internat. Symp. Liege 1968, Amsterdam: Excerpta Medica Found. 1968

54. Dixon G.H. und A.C. Wardlaw
Nature (London) 188 721 (196o)

55. Du Y.C., Y.S. Zhang, Z. X. Lu und C.L. Tsou
Scientia sinica (Peking) 1o 84 (1961)

56. Katsoyannis P.G., A. Tometsko und K. Fukuda
J. Amer. chem. Soc. 85 2863 (1963)

57. Meienhofer J., E. Schnabel, H. Brenner, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn
Z. Naturforsch. 18b 112o (1963)

58. Kung Y.T., Y.C. Du, W.T. Huang, C.C. Chen, L.T. Ke, S.C. Hu, R.Q. Jiang, S.Q. Chu, C.I. Niu, J.Z. Hsu, W.C. Chang, L.L. Cheng, H.S. Li, Y. Wang, T.P. Loh, A.H. Chi, C.H. Li, P.T. Shi, Y.H. Yie, K.L. Tang und C.Y.Hsing
Scientia sinica (Peking) 14 171o (1965)

59. Zahn H., T. Okuda und Y. Shimonishi
Proceedings of the Eighth European Peptide Symposium Noordwijk, the Netherlands September 1966, North-Holland Publishing Company - Amsterdam (1967)

6o. Katsoyannis P.G., A.C. Trakatellis, C. Zalut, S. Johnson, A. Tometsko, G. Schwartz und J. Ginos
Biochemistry 6 2656 (1967)

61. Merrifield R.B.
J. Amer. chem. Soc. 85 2149 (1963)

62. Marglin A. und R.B. Merrifield
J. Amer. chem. Soc. 88 5o51 (1966)

63. Merrifield R.B.
J. Amer. chem. Soc. 86 3o4 (1964)

64. Merrifield R.B.
Biochemistry 3 1385 (1964)

65. Merrifield R.B.
J. org. Chemistry 29 3loo (1964)

66. Carpino L.A.
J. Amer. chem. Soc. 79 98 (1957)
79 4427 (1967)

67. Najjar V.A. und R.B. Merrifield
Biochemistry 5 3765 (1966)

68. Klostermeyer H., J. Halstrøm, P. Kush, J. Föhles und W. Lunkenheimer
siehe lc. 59

69. Sieber P. und B. Iselin
Helv. chim. Acta 51 622 (1968)

7o. Halpern B. und E. Nitecki
Tetrahedron Letters 3o31 (1968)

71. Sheehan J.C. und G.P. Hess
J. Amer. chem. Soc. 77 1o65 (1955)

Sheehan J.C., M. Goodman und G.P. Hess
J. Amer. chem. Soc. 78 1367 (1956)

72. Woodward R.B., R.A. Olofson und H. Mayer
J. Amer. chem. Soc. 83 1olo (1961)

73. Bodanzsky M. und J.T. Sheehan
Chem. and Ind. (London) 1423 (1964)
1957 (1966)

74. Beyerman H.C., C.A.M. Boers-Boonekamp, W.J. van Zoest und D. van den Berg
siehe lc. 59

75. Hörnle S.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348 1355 (1967)

76. Kessler W. und B. Iselin
Helv. chim. Acta 49 133o (1966)

77. Ohno M. und C.B. Anfinsen
J. Amer. chem. Soc. 89 5994 (1967)

78. Leonard J. und R.B. Robinson
J. Amer. chem. Soc. 89 181 (1967)

79. Sakakibara S., Y. Nobuhara, Y. Shimonishi und R. Kiyai
Bull. chem. Soc. Japan 4o 2164 (1967)

8o. Halpern B., L. Chew, V. Close und W. Patton
Tetrahedron Letters 5163 (1968)

81. Loffet A.
Experentia 23 4o6 (1967)

82. Mizoguchi T., G. Levin, D.U. Woolley und J.M. Stewart
J. org. Chem. 33 9o3 (1968)

83. Weygand F. und R. Obermeier
Z. Naturforsch. 23b 139o (1968)

84. Weygand F. und U. Ragnarsson
Z. Naturforsch. 21b 1141 (1966)

85. Richards F.F., W. Sloane jr. und E. Haber
Biochemistry 6 476 (1967)

85a. Stewart J.M. und D.M. Woolley
Nature (London) 2o6 614 (1965)

86. Marshall G.R. und R.B. Merrifield
Biochemistry 4 2394 (1965)

87. Khosla M.C., R.B. Smeby und F.M. Bumpus
Biochemistry 6 754 (1967)

88. Park K., R.B. Smeby und F.M. Bumpus
Biochemistry 6 3458 (1967)

89. Halström J. und H. Klostermeyer
Liebigs Ann. Chem. 715 2o8 (1968)

9o. Klostermeyer H.
Chem. Ber. 1o1 2823 (1968)

91. Zahn H., T. Okuda und Y. Shimonishi
Angew. Chem. 79 424 (1967)

92. Manning M.
J. Amer. chem. Soc. 9o 1348 (1968)

93. Bayer E. und H. Hagenmaier
Tetrahedron Letters 17 2o37 (1968)

94. Ives D.A.
Canad. J. Chem. 46 2318 (1968)

95. Beyerman H.C., G.A.M. Boers-Boonenkamp und
H. Maasen van den Brink
Recueil Trav. chim. Pays-Bas 87 257 (1968)

96. Inukai N., K. Nakano und M. Murukami
Bull. chem. Soc. Japan 41 182 (1968)

97. Takashima H., V. du Vigneaud und R.B. Merrifield
J. Amer. chem. Soc. 9o 1323 (1968)

98. Manning M., T.C. Wuu, J.W.M. Boxter und W.H. Sawyer
Experentia 24 659 (1968)

99. Bayer E., G. Jung und H. Hagenmaier
Tetrahedron Letters 4853 (1968)

loo. Gutte B. und R.B. Merrifield
J. Amer. chem. Soc. 91 5ol (1969)

lol. Young J.D., E. Benjamini, J.M. Stewart und C.Y. Leung
Biochemistry 6 1455 (1967)

lo2. Khosla M.C., N.C. Chaturvedi, R.B. Smeby und F.M. Bumpus
Biochemistry 7 3417 (1968)

lo3. Meienhofer J. und Y. Sano
J. Amer. chem. Soc. 9o 2969 (1968)

lo4. Weitzel G., U. Weber, S. Hörnle und F. Schneider
Peptides 1968, North-Holland Publishin Company
Amsterdam (1968)

lo5. Letsinger R.C. und M.J. Kornet
J. Amer. chem. Soc. 85 3o45 (1963)

Letsinger R.C., M.J. Kornet und A.A. Kiryushikin
ibid. 86 5163 (1964)

lo6. Shemyakin M.M., Y.A. Ovhinnikov, I.V. Kozhenikova
und A.A. Kiryushikin
Tetrahedron Letters 2323 (1965)

lo7. Fridkin M., A. Patchornik und E. Katchalski
J. Amer. chem. Soc. 88 3164 (1966)

lo8. Patchornik A., M. Fridkin und E. Katchalski
siehe lc. 59

109. Wieland Th. und Chr. Birr
Angew. Chem. 78 303 (1966), siehe auch lc. 59

110. Fridkin M., A. Patchornik und E. Katchalski
J. Amer. chem. Soc. 87 4646 (1965)

111. Losse G., L. Madlung und P. Lorenz
Chem. Ber. 101 1257 (1968)

112. Tesser G.I. und B.W.J. Ellenbroek
siehe lc. 59

113. Schreiber J.
siehe lc. 59

114. Du Y.C., R.Q. Yiang und C.L. Tsou
Scientia sinica Peking 14 229 (1965)

115. Katsoyannis P.G., A.C. Trakatellis, S. Johnson,
C. Zalut und G.P. Schwartz
Biochemistry 6 2642 (1967)

116. Katsoyannis P.G. und A. Tometsko
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 55 1554 (1966)

117. Pruitt K.M., B.S. Robinson und B.R. Boshell
Biopolymers 4 351 (1966)

118. Hörnle S.
unveröffentlicht

119. Zahn H., B. Gutte, E.F. Pfeiferer und J. Ammon
Liebigs Ann. Chem. 691 225 (1966)

120. Zahn H. und E. Drechsel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349 385 (1968)

121. Sakakibara S., M. Shin, M. Fujino, Y. Shimonoshi,
S. Inoue und N. Inukai
Bull. chem. Soc. Japan 38 1522 (1965)

122. Zervas L., D. Borovas und E. Gazis
J. Amer. chem. Soc. 85 3660 (1963)

123. Inukai N., K. Nakano und M. Murakami
Bull. chem. Soc. Japan 4o 2913 (1967)

124. Merrifield R.B. und A. Marglin
siehe lc. 59

125. Benisek W.F., M.R. Raftery und R.D. Cole
Biochemistry 6 378o (1967)

126. Schnabel E.
Liebigs Ann. Chem. 7o2 188 (1967)

127. Wünsch E., G. Fries und A. Zwick
Chem. Ber. 91 542 (1958)

128. Neuberger A. und F. Sanger
Biochem. J. 37 515 (1943)

129. Du Vigneaud V. und O.K. Berens
J. biol. Chem. 117 27 (1937)

13o. Harington C.R. und T.H. Mead
Biochem. J. 3o 1598 (1936)

131. Grassmann W., E. Wünsch, P. Deufel und E. Zwick
Chem. Ber. 91 538 (1958)

132. Zervas L., M. Winitz und J.P. Greenstein
J. org. Chem. 22 1515 (1967)

133. Rachmachandran J. und C.H. Li
J. org. Chem. 27 4oo6 (1962)

134. Zahn H., W. Dunho und B. Gutte
Z. Naturforsch. 21b 763 (1966)

135. Schröder E. und E. Klieger
Liebigs Ann. Chem. 673 2o8 (1964)

136. Spackman D.H., W.H. Stein und S. Moore
Analytic. Chem. 3o 119o (1958)

137. Wünsch E. und F. Drees
Chem. Ber. 99 11o (1966)

138. Weygand F., W. Steglich und N. Chytil
Z. Naturforsch. 23b 1391 (1968)

139. Khorana H.G.
Chem. and Ind. 1955 1087

140. Katsoyannis P.G.
6th Congr. Intern. Diabetes Fed. Stockholm 1967

141. Katsoyannis P.G., A. Tometsko, C. Zalut, S. Johnson und A. Trakatellis
Biochemistry 6 2635 (1967)

142. Wünsch E. und E. Jäger
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 346 (1966)

143. Carpino C.A., A. Giza und B.A. Carpino
J. Amer. chem. Soc. 81 955 (1959)

144. Bergmann M. und L. Zervas
Chem. Ber. 65 1192 (1932)

145. Guttmann S. und R.A. Boissonnas
Helv. chim. Acta 41 1864 (1958)

146. Katsoyannis P.G., A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. chem. Soc. 89 4505 (1967)

147. Young D.M. und A.H. Lewis
Science (New York) 105 (1947)

L e b e n s l a u f

Am 15. Dezember 1940 wurde ich als Sohn des Chefarztes Prim.Dr.med.habil. Sigbert Zollner und seiner Ehefrau Karla, geb. Grabner, in Klagenfurt, Österreich, geboren.

Nach Absolvierung der Volksschule in Klagenfurt besuchte ich das Bundesrealgymnasium in Klagenfurt, an dem ich im Juli 1958 die Matura ablegte.

Im Wintersemester 1958/59 belegte ich an der Technischen Hochschule Graz Chemie und wurde im März 1967 nach erfolgreich bestandener I. und II. Staatsprüfung zum Dipl.Ing. graduiert.

Im Juli 1967 begann ich mit der Bearbeitung des in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Themas unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	F. Schneider, G. Weitzel
Anorganische Chemie:	H. Grubitsch, K. Torkar
Organische Chemie:	A. v. Wacek
Physikalische Chemie:	O. Kratky, K. Torkar
Physik:	R. Gebauer, E. Ledinegg
Biochemie:	G. Gorbach
Mathematik:	B. Baule
Mineralogie:	H. Heritsch, A. Winkler v. Hermaden
Maschinenkunde:	K. Adamik
Meß- und Regeltechnik:	R. Schuy.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen